



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
INNSBRUCK

MUI-START Bericht

Jänner 2013 - Juni 2015



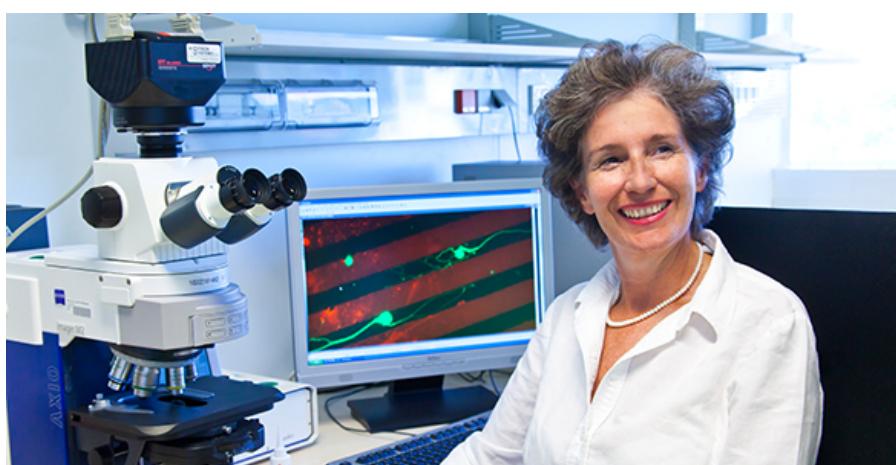
Vorwort

Die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses ist eine der wichtigsten Aufgaben einer Universität. Daher ist es sehr erfreulich, dass sich das Nachwuchsförderprogramm MUI-START in den vergangenen 4 Jahren als intramurale Forschungsförderung an der Medizinischen Universität Innsbruck bestens etabliert hat.

Das als Anschub- und Einstiegsförderung konzipierte und speziell an die Bedürfnisse des wissenschaftlichen Nachwuchses angepasste Förderprogramm unterstützt Forschung in Grundlagen-, Krankheits- (sowie Krankheitsmodellsystemen) und Patienten-orientierten Projekten. Durch diese Anschubfinanzierung wird jungen WissenschaftlerInnen direkt nach der Promotion die Möglichkeit gegeben, substanzelle Vorarbeiten für eigenständige Anträge zu planen und durchzuführen. Mit MUI-START werden unsere WissenschaftlerInnen an die Anforderungen nationaler und internationaler Fördergeber herangeführt und erhalten die Möglichkeit, mit einem ersten eigenständigen Antrag ihre Position in der Wissenschaftslandschaft zu festigen.

Der Erfolg dieses Konzeptes hat sich bereits in den ersten vier Förderperioden anhand der aus diesen Projekten entstandenen erfolgreichen Drittmittelförderungen (z.B. FWF-Einzelprojekte, ein OeNB-Projekt) sowie anhand der aus dieser Finanzierung entstandenen Publikationen in anerkannten internationalen Journals gezeigt.

Univ. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Christine Bandlow
Vizerektorin für Forschung und Internationales



Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	6
2.	MUI-START JURY (bisher aktive Mitglieder).....	9
3.	AUSSCHREIBUNGEN.....	11
4.	PROJEKTLISTEN	14
4.1	Abgeschlossene Projekte	14
	- bis Ende 2012.....	14
	- bis Ende 2013.....	14
	- bis Ende 2014.....	16
	- bis Mitte 2015.....	17
4.2	Laufende Projekte	18
5.	ABSCHLUSSBERICHTE der MUI-START Projekte.....	21
	- Projektabschlussberichte der 1. Antragsperiode.....	21
	- Projektabschlussberichte der 2. Antragsperiode.....	56
	- Projektabschlussberichte der 3. Antragsperiode.....	71
	- Projektabschlussberichte der 4. Antragsperiode.....	113
6.	LITERATURVERZEICHNIS (Publikationen der abgeschlossenen MUI-START Projekte mit MUI-START Erwähnung).....	118
7.	EINGWORBENE DRITTMITTEL (der abgeschlossenen MUI-START Projekte)	121
8.	EVALUATION der MUI-START Projekte	123
9.	STATISTIKEN zu den MUI-START Projekten.....	124
10.	FINANZIELLE ASPEKTE zu MUI-START	127

1. EINLEITUNG

Das Nachwuchsförderprogramm MUI-START wurde 2010 erstmalig ausgeschrieben und hat sich seither als intramurales Nachwuchswissenschaftlerförderinstrument sehr gut etabliert. Wie schon das vorangegangene Nachwuchsförderprogramm MFI (Medizinische Forschungsförderung Innsbruck) hat sich deutlich gezeigt, dass ein solches intramurales Nachwuchsförderprogramm nicht nur für die NachwuchswissenschaftlerInnen eine karrierefördernde Unterstützung bietet, sondern auch zur allgemeinen Steigerung des Drittmittelaufkommens an der Universität beiträgt.

Bei der Einschätzung des MUI-START Programmes muss natürlich die mit vier-einhalb Jahren bisher eher kurze Laufzeit des Programmes berücksichtigt werden. Das Gesamtantragsvolumen bei MUI-START ist deutlich geringer als dies beim Vorgängerprogramm MFI der Fall war.

Antragsberechtigt sind grundsätzlich alle MitarbeiterInnen der Medizinischen Universität, die ein Doktorats Studium (oder Medizinstudium mit 3 Jahren Forschungserfahrung) abgeschlossen haben, noch nicht habilitiert sind und die zum Antragszeitpunkt das 37. Lebensjahr noch nicht vollendet haben (Ausnahmen können bei besonderer Begründung gewährt werden: z. B. Kindererziehungszeiten).

Während der ersten beiden Ausschreibungsrunden war die maximale Fördersumme mit 50.000 Euro pro Jahr fixiert. Neben Sachmitteln und Kleininvestitionen konnte auch um Personalstellen angesucht werden. Das Programm bestand aus zwei Förderschienen:

MUI-START 1: Zwischenfinanzierung zur Unterstützung der Wiedereinreichung eines abgelehnten FWF-Antrages. Laufzeit 1 Jahr.

MUI-START 2: Eigenständiges Projekt. Laufzeit max. 2 Jahre.

Einsparungsmaßnahmen der Universität machten eine Überarbeitung der MUI-START-Richtlinien erforderlich, so dass seit der 3. Ausschreibungsrunde keine Personalstellen mehr beantragt werden können. Im Rahmen der Projektanträge kann allerdings in begründeten Sonderfällen um Mittel für geringfügig beschäftigte MitarbeiterInnen angesucht werden. Eine Aufteilung in MUI-START 1 und MUI-START 2 ist inzwischen nicht mehr vorgesehen. In der derzeitigen Ausschreibung können sowohl Einzelprojekte als auch Tandemprojekte (zwei NachwuchswissenschaftlerInnen arbeiten zusammen an einem Antrag) eingereicht werden. Als Gesamtfördersumme können pro Antragsteller für eine Laufzeit von 2 Jahren nur noch maximal 30.000 Euro beantragt werden (Sachmittel, Kleininvestitionen). Die Ausschreibung erfolgt einmal pro Jahr.

Ausschreibung	Eingelangte Anträge	Beantragte Fördersumme gesamt	Bewilligte Fördersumme gesamt
1. Ausschreibung Sommer 2010 Vergabe: November 2010	31 Anträge (5 aus formellen Gründen nicht förderfähig)	€ 2.074.365,70 alle Projekte	€ 667.054,80 für 13 Projekte
2. Ausschreibung November 2010 Vergabe: Juni 2011	11 Anträge	€ 629.968,95	€ 173.171,00 für 5 Projekte
3. Ausschreibung November 2011 Vergabe: Juli 2012	29 Anträge	€ 742.808,21	€ 240.000,00 für 9 Projekte
4. Ausschreibung März 2013 Vergabe: Juni/Juli 2013	28 Anträge (2 aus formellen Gründen nicht förderfähig)	€ 713.652,93	€ 323.484,66 für 14 Projekte
5. Ausschreibung März 2014 Vergabe: Juli 2014	31 Anträge	€ 771.750,48	€ 260.826,60 für 12 Projekte
6. Ausschreibung April 2015 Vergabe: Juli und Oktober 2015	28 Anträge	€ 711.035,41	Noch offen

Die MUI-START Jury hat in ihrer ersten Sitzung (Juli 2015) vier Projektanträge der sechsten Ausschreibungsperiode bewilligt. Neun weitere Anträge befinden sich in der zweiten Begutachtungsphase und werden in einer Sitzung im Oktober entschieden werden.

Die Art der Begutachtung hat sich im Laufe der Zeit nicht geändert. Die Projekte werden nach wie vor durch mindestens zwei internationale GutachterInnen bewertet. Ein Gremium (MUI-START Jury, ausgewählt durch die Vizerektorin für Forschung und Internationales) wählt die zu fördernden Projekte aus. Zu den einzelnen Projekten wird jeweils ein/e ReferentIn aus diesem Gremium benannt. Dieser/diese wählt die externen GutachterInnen auf Vorschlag des Servicecenter

Einleitung

Forschung (bisherige Vorauswahl über die Wissenschaftliche Referentin und Nachwuchskoordinatorin Dr. Bettina Krüger/Dr. María Pérez Mediavilla) aus und stellt das Projekt und die zugehörigen Gutachten im Gremium vor.

Für die mittelfristige Zukunftsplanung ist weiterhin je eine MUI-START-Ausschreibung pro Jahr vorgesehen. In jeder Ausschreibungsrunde sollen 8-12 Projekte gefördert werden.

In den letzten drei Jahren wurde jeweils ein MUI-START-Symposium durchgeführt und auch heuer ist ein MUI-START Symposium vorgesehen (im Oktober 2015). Anlässlich dieser Veranstaltung stellen die jungen WissenschaftlerInnen ihre Ergebnisse in Form von Vorträgen und Postern vor. Im Sinne einer Optimierung von Effizienz und Qualität der inneruniversitären Forschungsförderung bot das dritte MUI-START Symposium erstmals die Gelegenheit, eine Abschluss- und Zwischenevaluation der Projekte durchzuführen. Die regen Diskussionen und der Austausch unter den beteiligten MUI-START-ProjektleiterInnen, ReferentInnen und anderen interessierten WissenschaftlerInnen haben diese Symposien zu erfolgreichen Veranstaltungen werden lassen und sind nun fixer Bestandteil im Jahresveranstaltungskalender der MUI.

2. MUI-START JURY (bisher aktive Mitglieder)

Mitglieder

Univ.-Prof. Dr. Gottfried BAIER	Sektion für Zellgenetik
Univ.-Prof. Dr. Christine BANDTLOW	Sektion für Neurobiochemie
Univ.-Prof. Dr. Georg DECHANT	Gemeinsame Einrichtung für Neurowissenschaften
Univ.-Prof. Dr. Francesco FERRAGUTI	Institut für Pharmakologie
Univ.-Prof. Dr. Ludger HENGST	Sektion für Medizinische Biochemie
Univ.-Prof. Dr. Lukas HUBER	Sektion für Zellbiologie
Univ.-Prof. Dr. Alexander HÜTTENHOFER	Sektion für Genomik und RNomik
o. Univ.-Prof. Dr. Werner JASCHKE	Universitätsklinik für Radiologie
Ao. Univ.-Prof. Dr. Stefan KIECHL	Universitätsklinik für Neurologie
Ao. Univ.-Prof. Dr. Rudolf KIRCHMAIR	Universitätsklinik für Innere Medizin III
Univ.-Prof. Dr. Katja KOTSCH	Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie
Univ.-Prof. Dr. Michaela KRESS	Sektion für Physiologie
o. Univ. -Prof. Dr. Martin KRISMER	Universitätsklinik für Orthopädie
Univ.-Prof. Dr. Dorothee von LAER	Sektion für Virologie
Univ.-Prof. Dr. Cornelia LASS-FLÖRL	Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Ao. Univ.-Prof. Dr. Alexandra LUSSER	Sektion für Molekularbiologie
Univ.-Prof. Dr. Gert MAYER	Universitätsklinik Innere Medizin IV
Univ.-Prof. Dr. Michael NOGLER	Universitätsklinik für Orthopädie
o. Univ.-Prof. Dr. Werner POEWE	Universitätsklinik für Neurologie
Ao. Univ.-Prof. Dr. Markus REINDL	Universitätsklinik für Neurologie
o. Univ.-Prof. Dr. Monika RITSCH-MARTE	Sektion für Biomedizinische Physik
o. Univ.-Prof. Dr. Richard SCHEITHAUER	Institut für Gerichtliche Medizin
Univ.-Prof. Dr. Matthias SCHMUTH	Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie
Univ.-Prof. Dr. Erich SCHMUTZHARD	Universitätsklinik für Neurologie
Ao. Univ.-Prof. Dr. Michael SCHOCKE	Universitätsklinik für Radiologie

Univ.-Prof. Dr. Günther SPERK	Institut für Pharmakologie
Priv.-Doz. Dr. Patrizia STOITZNER	Universitätsklinik für Dermatologie
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. David TEIS	Sektion für Zellbiologie
Univ.-Prof. Dr. Zlatko TRAJANOSKI	Sektion für Bioinformatik
Ao. Univ.-Prof. Dr. Günter WEISS	Universitätsklinik Innere Medizin I
Ao. Univ.-Prof. Dr. Johann WILLEIT	Universitätsklinik für Neurologie
Univ.-Prof. Dr. Johannes ZSCHOCKE	Sektion für Humangenetik

3. AUSSCHREIBUNGEN

1. Antragsperiode

AntragstellerInnen: Männlich: 11

Weiblich: 15

ProjektleiterInnen: Männlich: 7

Weiblich: 6

Förderquote 50 %

Beantragte Projekte: 26 eingegangene Anträge, 13 geförderte Anträge

Beantragte Fördersumme: € 2.074.365,70

Bewilligte Fördersumme: € 667.054,80

Sitzung des Wissenschaftlichen Beirats am 11.11.2010

2. Antragsperiode

AntragstellerInnen: Männlich: 4

Weiblich: 7

ProjektleiterInnen: Männlich: 2

Weiblich: 3

Förderquote 45 %

Beantragte Projekte: 11 eingegangene Anträge, 5 geförderte Anträge

Beantragte Fördersumme: € 629.968,95

Bewilligte Fördersumme: € 173.171,00

Sitzung des Wissenschaftlichen Beirats (MUI-START Jury) am 15.06.2011

3. Antragsperiode

AntragstellerInnen: Männlich: 11

Weiblich: 18

ProjektleiterInnen: Männlich: 4

Weiblich: 5

Ausschreibungen

Förderquote 31 %

Beantragte Projekte: 29 eingegangene Anträge, 9 geförderte Anträge

Beantragte Fördersumme: € 742.808,21

Bewilligte Fördersumme: € 240.000,00

Sitzung des Wissenschaftlichen Beirats (MUI-START Jury) am 12.07.2012

4. Antragsperiode

AntragstellerInnen: Männlich: 16
 Weiblich: 10

ProjektleiterInnen: Männliche: 11
 Weiblich: 3

Förderquote 54%

Beantragte Projekte: 26 eingegangene Anträge, 14 geförderte Anträge

Beantragte Fördersumme: € 713.652,93

Bewilligte Fördersumme: € 323.484,66

Sitzung des Wissenschaftlichen Beirats (MUI-START Jury) am 02.07.2013

5. Antragsperiode

AntragstellerInnen: Männlich: 11
 Weiblich: 20

ProjektleiterInnen: Männlich: 4
 Weiblich: 8

Förderquote 39 %

Beantragte Projekte: 31 eingegangene Anträge, 12 geförderte Anträge

Beantragte Fördersumme: € 771.750,48

Bewilligte Fördersumme: € 260.826,60

Sitzung der MUI-START Jury am 01.07.2014

6. Antragsperiode

AntragstellerInnen: Männlich: 16
 Weiblich: 12

Entscheidung noch offen

Beantragte Projekte: 28 eingegangene Anträge

Beantragte Fördersumme: € 711.035,41

Sitzungen der MUI-START Jury : 02.07.2015 und 28.10.2015

4. PROJEKTLISTEN

4.1 Abgeschlossene Projekte

- bis Ende 2012*

1. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Natascha Hermann-Kleiter (MUI – START 1)	Sektion für Zellgenetik	Orphan receptor NR2F6 as barrier against Th17-dependent autoimmunity - composite analysis of NR2F6-selective signal transduction in Th17CD4+ T cells	22.04.2011 – 21.04.2012
Wegene Borena (MUI – START 1)	Sektion für Virologie	Metabolic syndrome and cancer	01.03.2011 – 29.02.2012
Rohit Arora, Stefanie Erhart (MUI – START 1)	Universitätsklinik für Unfallchirurgie	Pressure distribution in malunited intraarticular distal radius fractures	14.03.2011 – 13.03.2012
Christian Ploner (MUI – START 2)	Universitätsklinik für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie	Cell death mechanisms in adipogenesis	01.01.2011 – 30.06.2012

2. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Andreas Ploner (MUI-START 2)	Sektion für Genomik und RNomik	A non-coding RNA expression library for the functional analysis of proliferation and differentiation of human adipocyte-derived stem cells	01.08.2011 – 31.12.2012

- bis Ende 2013

1. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Galina Apostolova	Gemeinsame Einrichtung für Neurowissenschaften	Role of Satb2 in postmitotic neuronal plasticity	01.03.2011 – 28.02.2013

*siehe MUI-START-Jahresbericht 2012

Birgit Frauscher	Universitätsklinik für Neurologie	Assessment of normative values of motor activity during sleep: a video-polysomnographic study in a representative tyrolean population sample	22.04.2011 – 21.04.2013
Peter Lackner	Universitätsklinik für Neurologie	Brain metabolic changes during the acute phase of murine cerebral malaria. In depth characterization of cell death mechanisms, glutamate associated excitotoxicity and potential treatment strategies	01.04.2011 – 31.03.2013
Martin Puhr	Universitätsklinik für Urologie	Identification of molecular mechanism responsible for docetaxel resistance in prostate cancer cell lines	13.05.2011 – 30.06.2013
Katharina Cima	Innere Medizin I	Drug target analysis in the pulmonary orphan disease pulmonary arterial hypertension	15.04.2011 – 14.04.2013
Robert Öllinger	Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie	The heme oxygenase-1 system and long – term organ graft survival – „tolerance“	01.04.2011 – 31.03.2013
Claudia Manzl	Sektion für Pathologie	A new role of caspase-2: parial rescue of p53 X-linked embryonic lethality by caspase-2 null mutation	01.03.2011 – 28.02.2013
Markus Theurl	Universitätsklinik für Innere Medizin III	Therapeutic angiogenesis by the neuropeptide cathestatin	14.02.2011 – 13.02.2013
Markus Schreitl	Sektion für Molekularbiologie	PhoG – a phosphatase functioning as a transcription factor in Aspergillus fumigatus?	01.04.2011 – 31.03.2013

2. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Nina Clementi	Sektion für Genomik und RNomics	Molecular characterization of ribosomal E-site function	15.08.2011 – 14.08.2013
Theresa Hautz	Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und	Targeting IL-1 β in composite tissue allotransplantations: Investigation of its local effect on skin rejection	20.10.2011 – 19.10.2013

Projektübersicht

Thoraxchirurgie			
Martina Stichlberger	Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin	Effects of vasopressin on migration and oxygen free radical release of human leukocytes	15.09.2011 – 31.12.2013
Rupert Oberhuber	Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie	Die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase im Bezug auf den Ischämie Reperfusionsschaden sowie auf die chronische Transplantat Dysfunktion	22.07.2011 – 21.07.2013

3. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
*Selma Tuzlak (vormals Denise Tischner)	Sektion für Entwicklungsimmunologie	Role of the prosurvival BCL-2 family protein A1 in T cell homeostasis and autoimmune disease	01.08.2012 – 31.12.2013
Janine Kimpel	Sektion für Virologie	Vesicular stomatitis virus pseudotyped with the glycoprotein of the lymphocytic choriomeningitis virus as an HIV vaccine vector	01.08.2012 – 31.10.2013
Anelia Dietmann	Universitätsklinik für Neurologie	Pathophysiology of global cerebral edema in aneurysmal subarachnoid hemorrhage - A cerebral microdialysis study	01.08.2012 – 28.02.2013

- bis Ende 2014

3. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Ulrike Binder	Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie	Galleria mellonella as a host model to study invasive fungal infections due to mucorales	01.08.2012 – 31.10.2014 ¹
Manfred Nairz	Universitätsklinik für Innere Medizin I	Effects of the erythropoietin-analogue ARA290 on the course of	01.08.2012 – 31.07.2014

* Projekt wurde mit reduziertem Budget und neuer Projektleiterin weitergeführt.

		chemically-induced colitis	
Michael Blatzer	Sektion für Molekularbiologie	BolA - a transcriptional regulator required for stress adaptation in <i>A. fumigatus</i> ?	01.08.2012 – 31.07.2014
Robert Sucher	Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie	Targeted immunomodulation by use of biologics to minimize/avoid maintenance immunosuppression in vascularized composite tissue allografts	01.08.2012 – 31.07.2014
Judith Hagenbuchner	Universitätsklinik für Pädiatrie II	Regulation of glycolysis and mitochondrial respiration by BIRC5/Survivin in neuronal tumor cells	01.08.2012 – 31.07.2014
Joachim Schmutzhard	Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde	The involvement of the inner ear in sepsis syndrome in the cecal ligation puncture (CLP) mouse model	01.08.2012 – 31.07.2014

¹Das Projekt wurde kostenneutral bis 31.12.2014 verlängert

4. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
James Wood	Institut für Pharmakologie	Dopaminergic modulation at synapses of the medial central amygdala	01.08.2013 – 31.07.2014 ²
Gert Klug	Universitätsklinik für Innere Medizin III	Circulating fetuin-A and arterial stiffness after acute ST-segment elevation myocardial infarction	01.08.2013 – 30.09.2014 ³

²Das Projekt wurde kostenneutral bis 31.10.2014 verlängert

³ Das Projekt wurde kostenneutral bis 31.03.2015 verlängert

- bis Mitte 2015

4. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Sebastian Herzog	Sektion für Entwicklungsimmunologie	Regulation of B cell development by long non-coding RNAs	01.08.2013 – 28.02.2015

4.2 Laufende Projekte

4. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Ramon Tasan	Institut für Pharmakologie	Characterization of neurokinin B neurons in the amygdala and their role in anxiety and fear	01.08.2013 – 31.07.2015
Kerstin Siegmund	Sektion für Zellgenetik	Coronin 1A – potential modulator of the TGF- β signaling pathway influencing Treg/Th17 balance	01.08.2013 – 31.07.2015
Elke Griesmaier	Universitätsklinik für Pädiatrie II	Neuroprotective potential of sigma-1 receptor agonists in in vitro models of neonatal brain injury	01.08.2013 – 31.07.2015
Christa Pfeifhofer-Obermair	Sektion für Zellgenetik	PKCO is essential for protective immunity against infection with <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	01.08.2013 – 31.07.2015
Hannes Neuwirt	Universitätsklinik für Innere Medizin IV	Complement system and MAPK signaling in calcineurin-inhibitor induced nephrotoxicity	01.10.2013 – 30.09.2015
Gregor Brössner	Universitätsklinik für Neurologie	Non-invasive measurement of brain temperature in magnetic resonance imaging	01.12.2013 – 30.11.2015
Michiel Langeslag	Sektion für Physiologie	FABRYpain: Understanding pain in FABRY disease	01.09.2013 – 31.08.2015
Benno Cardini	Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie	Simvastatin and tetrahydrobiopterin biosynthesis in the prevention of chronic allograft vasculopathy	01.11.2013 – 31.10.2015
Oliver Schmidt	Sektion für Zellbiologie	The functional characterization of golgi tethering factors in a stress response to defective membrane protein degradation	01.08.2013 – 31.07.2015
Cedric Hubert De Smet	Sektion für Zellbiologie	Endosomal biogenesis: a delicate interplay between proteins and lipids	01.08.2013 – 31.07.2015

Martin Bodner	Institut für Gerichtliche Medizin	Helena, the hidden beauty - Molecular dissection of West Eurasia's most common mitochondrial DNA haplogroup H at the highest resolution	01.08.2013 – 31.07.2015
---------------	-----------------------------------	---	-------------------------

5. Antragsperiode

AntragstellerIn	Institut/Klinik	Titel	Laufzeit
Laura Zamarian	Universitätsklinik für Neurologie	Decision making abilities in patients with multiple sclerosis-Assessment and training	01.10.2014 – 30.09.2016
Astrid Grams	Universitätsklinik für Neuroradiologie	Intracranial aneurysms as a hypertensive disease	01.10.2014 – 30.09.2016
Daniela Kuzdas-Wood	Universitätsklinik für Neurologie	Cardiovascular phenotyping of a transgenic mouse model for multiple system atrophy	01.10.2014 – 30.09.2015
Natalia Schiefermeier	Sektion für Physiologie und Medizinische Physik	micro RNAs in axonal regeneration: Regulation of mir-138 and mir-21 by gp130 signaling in peripheral nerve injury and recovery	01.10.2014 – 30.09.2016
Gabriele Freifrau von Gleisenthal	Universitätsklinik für biologische Psychiatrie	Tryptophan and kynurenone metabolism in alcohol dependent patients in acute and medium-term withdrawal	01.10.2014 – 29.02.2016
Martin Puhr	Universitätsklinik für Urologie	Identification and assessment of altered miRNA expression profiles to improve early prostate cancer detection	01.10.2014 – 30.09.2016
Mario Gründlinger	Sektion für Molekularbiologie	Peroxisomal import pathways and their role in <i>Aspergillus fumigatus</i> virulence and adaptation	15.11.2014 – 14.10.2016
Isabel Heidegger	Universitätsklinik für Urologie	The role and impact of the tumor endothelial regulator "Robo4" in prostate cancer	01.10.2014 – 30.09.2016
Johanna Gostner	Sektion für Medizinische Biochemie	Formaldehyde metabolism - on the role of formaldehyde in	01.10.2014 – 29.02.2016

Projektübersicht

inflammation-			
Lourdes Rocamora-Reverte	Sektion für Entwicklungs-immunologie	GC production in the thymus and its influence on T cell development	01.10.2014 – 30.09.2016
Luca Fava	Sektion für Entwicklungs-immunologie	Caspase-2 in cell death induced by polyploidization	01.10.2014 – 30.09.2016
Ingo Bauer	Sektion für Molekularbiologie	AN4022-A novel HDAC complex component as basis for a novel antifungal therapy	01.10.2014 – 30.09.2016

5. ABSCHLUSSBERICHTE der MUI-START Projekte

Für den Inhalt der Abschlussberichte sind die jeweiligen Projektleiterinnen verantwortlich.

- Projektabchlussberichte der 1. Antragsperiode

Der Abschlussbericht von Frau Dr. Galina Apostolova (Role of Satb2 in postmitotic neuronal plasticity) liegt dem Servicecenter Forschung vor. Aufgrund der Aktualität der Ergebnisse und des Umstandes, dass diese noch nicht publiziert wurden, ist dieser Abschlussbericht nicht veröffentlicht worden.

Assessment of normative values of motor activity during sleep: A video-polysomnographic study in a representative tyrolean population sample

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Birgit Frauscher

Universitätsklinik für Neurologie

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 22.04.2011 – 21.04.2013

Zusammenfassung

Framework / aim of the current project:

Many sleep disorders are characterized by increased motor activity during sleep. Differentiation between normal and abnormal motor activity is a challenge. Whereas there are several normative sex- and age-sampled studies for sleep using polysomnography, normative studies for motor phenomena during sleep have only been performed for very few motor phenomena such as periodic leg movements (PLM) in sleep and REM-sleep related EMG activity, but not at all for others such as high frequency leg movements (HFLM), fragmentary myoclonus (FM) and neck myoclonus (NM). A clear differentiation between physiological and pathological motor phenomena, however, is crucial considering the importance of REM sleep without atonia in relation to the development of a neurodegenerative disease. Of note, up to 80 % of subjects with initially diagnosed idiopathic RBD will eventually develop a neurodegenerative disease during an observational period of 20 years. The aim of the current project was to investigate a large range of motor events (isolated leg movements (LM), PLM; HFLM, FM, NM, and REM-related EMG activity) during polysomnography in physiological sleep in order to generate sex and age group-dependent normative values for the respective motor phenomena. For this study, we carefully selected 100 healthy subjects (60 women, 40 men) between 19 and 79 years of age with no relevant sleep disorder and no CNS active medication from an existing population sample representative for the Tyrolean population.

Key findings:

Non-bothersome forms of sleep-related movement disorders and parasomnias are still present: In this population of healthy sleepers, non-bothersome forms of recognizable sleep-related movement disorders (45 %) and parasomnias (36 %) are still surprisingly common, but they were either infrequent or not subjectively bothersome. These findings may suggest that diagnostic criteria of sleep disorders should not only be based on the presence of symptoms but also account for a minimum frequency or discomfort (for details see Frauscher B et al. J Clin Sleep Med 2014 in press).

Motor events during polysomnography are common in physiological sleep: Thirty-six subjects had a PLMS index > 5/h indicative for a clinically relevant PLMS index, 18 had a PLMS index > 15/h supportive for a diagnosis of restless legs syndrome or a diagnosis of PLM disorder. Ninety percent of subjects had a PLMS index between 0 and 24.8/h. Thirty-three subjects had HFLM (90th-percentile: 4 sequences per night). All subjects had FM (90th-percentile 143.7/h sleep). Nine subjects fulfilled AASM criteria for excessive FM. Thirty-five subjects had NM (90th-percentile: 8.8/h REM sleep). For REM sleep, different EMG activity measures for the mentalis and flexor digitorum superficialis muscles were calculated: The 90th percentile for the SINBAR EMG activity index was 31.2%. Eight subjects exceeded the SINBAR cut-off for RBD of 32%. For more detailed information see Frauscher et al. Sleep 2014 in press. The

abovedescribed findings confirm that quantification of motor phenomena recorded during polysomnography is a basic prerequisite to develop normative values. Quantification is a first step toward a more precise description of the various motor phenomena present during sleep. Because rates of motor events were unexpectedly high even in physiological sleep, the future use of normative values for both research and clinical routine is essential.

Future directions:

The next step is to assess cut-off scores when comparing these normative values to values gained from different sleep pathologies such as restless legs syndrome, REM- and nonREM-parasomnias and narcolepsy. This follow-up project is currently in progress and is supported by a grant of the Austrian science fund (KLIF236). Another follow-up project elucidates the clinical meaning of REM sleep without atonia. Currently it is unknown whether REM sleep without atonia is a precursor of RBD or not. This ongoing project is funded by the Jubiläumsfond of the Österreichische Nationalbank (15127).

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Frauscher, Birgit; Gabelia, David; Mitterling, Thomas; Biermayr, Marlene; Bregler, Deborah; Ehrmann, Laura et al. (2014): Motor events during healthy sleep: a quantitative polysomnographic study. In: *Sleep* 37 (4), S. 763-73, 773A-773B. (IF 4,591)

Frauscher, Birgit; Mitterling, Thomas; Bode, Aleke; Ehrmann, Laura; Gabelia, David; Biermayr, Marlene et al. (2014): A prospective questionnaire study in 100 healthy sleepers: non-bothersome forms of recognizable sleep disorders are still present. In: *Journal of clinical sleep medicine* 10 (6), S. 623–629. (IF 3,053)

Gabelia, David; Mitterling, Thomas; Högl, Birgit; Wenning, Gregor K.; Frauscher, Birgit (2014): Do periodic arm movements during sleep exist in healthy subjects? A polysomnographic study. In: *Sleep medicine* 15 (9), S. 1150–1154. (IF 3,154)

Externe Förderung

Grant (project number: KLI236) by the Austrian Science Fund (FWF) for the project „Motor activity during sleep in health and disease“

Grant (project number: 15127) by the Jubiläumsfond of the Österreichische Nationalbank for the project „REM sleep without atonia: early sign of neurodegeneration“

Brain metabolic changes during the acute phase of murine cerebral malaria. In depth characterization of cell death mechanisms, glutamate associated excitotoxicity and potential treatment strategies

Priv.-Doz. Dr.med.univ. Peter Lackner

Universitätsklinik für Neurologie

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.04.2011 – 31.03.2013

Zusammenfassung

Wissenschaftliche Ergebnisse:

Charakterisierung der metabolischen Veränderungen und Zelltod-Mechanismen im Gehirn bei der zerebralen Malaria

Wir konnten erstmals erfolgreich *in vivo* Messungen von interstitiellem zerebralem Glutamat über 8 Tage bei der zerebralen Malaria durchführen. Wir konnten zeigen, dass Glutamat in der Spätphase der Erkrankung hochreguliert wird. Interessanterweise fanden sich aber auch bereits in den ersten beiden Tagen nach Infektion Glutamat Peaks im Gehirn von Tieren die später Zerebrale Malaria entwickeln sollten. Überaschenderweise konnten andere Metaboliten (Glucose, Lactat, Pyruvat) nur über 48 Stunden stabil gemessen werden. Derzeit laufen Untersuchungen die die Ursachen dafür erheben sollen. Dies ist klinisch höchst relevant da auch am kritisch kranken Patienten häufig die zerebrale Glucose nach 1-2 Tagen ohne ersichtlichen Grund abfällt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Inhibition des NMDA-Rezeptors nach Beginn der klinischen Symptome einer zerebralen Malaria zu einem signifikanten Ansteigen der Überlebenswahrscheinlichkeit führt. Immunhistochemisch konnten wir zeigen, dass die Inhibition des NMDA-Rezeptors zu einer Reduktion von Microhämorrhagien im Gehirn führt und neuronaler Zelltod dadurch effektiv unterbunden wird.

Kooperation mit Schroll A. und Weiss G – Regulation von TIM-3 und TIM-4 bei der zerebralen Malaria

Die T-Zell Immunglobulin und Mucin-Domäne stellt eine neue entdeckte Genfamilie von Typ-I Membranproteinen dar die eine elementare Rolle in der Regulation der T-Zell vermittelten Immunantwort darstellen. TIM-3 ist selektiv auf Th-1 Zellen exprimiert, während TIM-4 sich auf Antigen präsentierenden Zellen findet. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass TIM-3 und TIM-4 bei Tieren mit zerebraler Malaria im Vergleich zum nicht zerebralen Verlauf sehr unterschiedlich reguliert sind. Derzeit laufen weitere Versuche um den zugrundeliegenden Mechanismus genauer zu untersuchen.

Seitenprojekt - Pathophysiologie des Zerebralen Vasospasmus bei der Subarachnoidalblutung

Wir konnten an Seren von 20 Patienten mit Subarachnoidalblutung sowie 20 gesunden Kontrollen die zwischen 2007 und 2009 im Rahmen einer akademischen Eigenstudie abgenommen wurden, die Bedeutung von Matrix-Metalloproteinase (MMP-3, MMP-9) und deren Gewebeinhibitoren (TIMP-1, TIMP-3) untersuchen. Dabei fanden wir eine deutliche Dysbalance von MMP-9 und TIMP-1 bei Patienten die einen zerebralen Vasospasmus entwickelt hatten. Die Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 stiegen verzögert im Verlauf der Erkrankung an was eine wichtige Rolle von proinflammatorischen Mechanismen bei der Entstehung eines zerebralen Vasospasmus nahelegt. In einer weiteren Studie wurde dieselben Seren mittels eines Quantitativen Protein Arrays untersucht. Der Array misst 30 verschiedene Faktoren die im Rahmen von Angiogenese und Inflammation eine Rolle spielen. In der

biostatistischen Auswertung konnten IL-6, RANTES, und die angiogenetischen Faktoren ENA-78 und Angiogenin mit der Entstehung eines Vasospasmus in Zusammenhang gebracht werden.

[Publikationen mit MUI-START Erwähnung](#)

Fischer, Marlene; Dietmann, Anelia; Beer, Ronny; Broessner, Gregor; Helbok, Raimund; Pfausler, Bettina et al. (2013): Differential regulation of matrix-metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: *PloS one* 8 (3), S. e59952. (IF 3,234)

Wechselberger, K. M.; Taferner, B.; Beer, R.; Broessner, G.; Helbok, R.; Fischer, M. et al. (2013): NMDA-receptor mediated excitotoxicity is involved in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. In: *Journal of the Neurological Sciences* 333, S. e700. (IF 2,474)

[Externe Förderung](#)

[Sonstiges](#)

Abstracts:

Meeting of the Austrian Neuroscience Association 2011

Taferner B, Singewald N, Schmutzhard E, Lackner P. Brain metabolic changes during the acute phase of murine cerebral malaria

Kongress der Arbeitsgemeinschaft für neurologische Intensivmedizin 2012

Taferner B, Wechselberger KM, Beer R, Broessner G, Dietmann A, Fischer M, Singewald N, Schmutzhard E, Lackner P. NMDA-receptor mediated excitotoxicity is involved in the neuropathogenesis of experimental cerebral malaria

Österreichische Gesellschaft für Parasitologie und Tropenmedizin 2012

Wechselberger KM, Taferner B, Beer R, Broessner G, Helbok R, Dietmann A, Fischer M, Singewald N., Schmutzhard E, Lackner P. NMDA-receptor mediated excitotoxicity is involved in the pathogenesis of experimental cerebral malaria

Kongress der Arbeitsgemeinschaft für neurologische Intensivmedizin 2013

Fischer M, Hashold K, Dietmann A, Beer R, Helbok R, Pfausler B, Reindl M, Schmutzhard E, Lackner P. Decrease of the pro-angiogenic factor ENA-78 in cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage.

Österreichischer Infektionskongress 2013

Lackner P, Wechselberger KM, Taferner B, Beer R, Broessner G, Helbok R, Dietmann A, Fischer M, Singewald N., Schmutzhard E. NMDA-receptor mediated excitotoxicity is involved in the pathogenesis of experimental cerebral malaria

Schroll A, Lackner P, Wechselberger K, Schmutzhard E, Weiss G. Regulation of Tim-3 and Tim-4 during Plasmodium berghei ANKA (PbA)-induced experimental cerebral malaria (ECM) in susceptible (C57BL/6) and resistant (BALB/c) mice.

Vasospasmuskonferenz Luzern 2013

Fischer M, Hashold K, Dietmann A, Beer R, Helbok R, Pfausler B, Reindl M, Schmutzhard E, Lackner P. Decrease of the pro-angiogenic factor ENA-78 in cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage

Welt Kongress für Neurologie 2013

Wechselberger KM, Taferner B, Beer R, Broessner G, Helbok R, Pfausler B, Schmutzhard E, Singewald N, Lackner P: NMDA-receptor mediated excitotoxicity is involved in the pathogenesis of experimental cerebral malaria.

[Abschlussberichte](#)

Preise

2013 Posterpreis der Österreichischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin an **Peter Lackner**

Identification of molecular mechanism responsible for docetaxel resistance in prostate cancer cell lines

Mag.rer.nat. Martin Puhr PhD
Universitätsklinik für Urologie

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 13.05.2011 – 30.06.2013

Zusammenfassung

To gain a greater insight into the molecular changes that lead to or are associated with docetaxel insensitivity the applicant has generated and characterized docetaxel resistant sublines of two standard prostate cancer cell lines (PC3 and DU145) at the beginning of the project.

These docetaxel resistant sublines were established by treatment with increasing concentrations of docetaxel up to a final concentration of 12.5 nM. Reduced docetaxel sensitivity was confirmed by measurement of proliferation, cell viability and apoptosis (Figure 1). Parental PC3 cells but not resistant PC3-DR cells treated with 12.5 nM docetaxel (Figure 1A, B) exhibit a significant decrease in proliferation and cell viability. DU-145-DR cells showed decreased basal proliferation and viability compared to parental DU-145 cells in the absence of docetaxel. However, in the presence of 12.5 nM docetaxel DU-145-DR cells display significantly higher proliferation and cell viability compared to their parental counterparts. Furthermore, after 3 days treatment with 12.5 nM docetaxel the percentage of apoptotic cells was assessed and quantified. Propidium iodide (PI) staining and FACS analysis revealed an increase in apoptosis (2.95% to 15.53%) in PC3 and (2.26% to 52.02%) in DU-145 cells (Figure 1C).

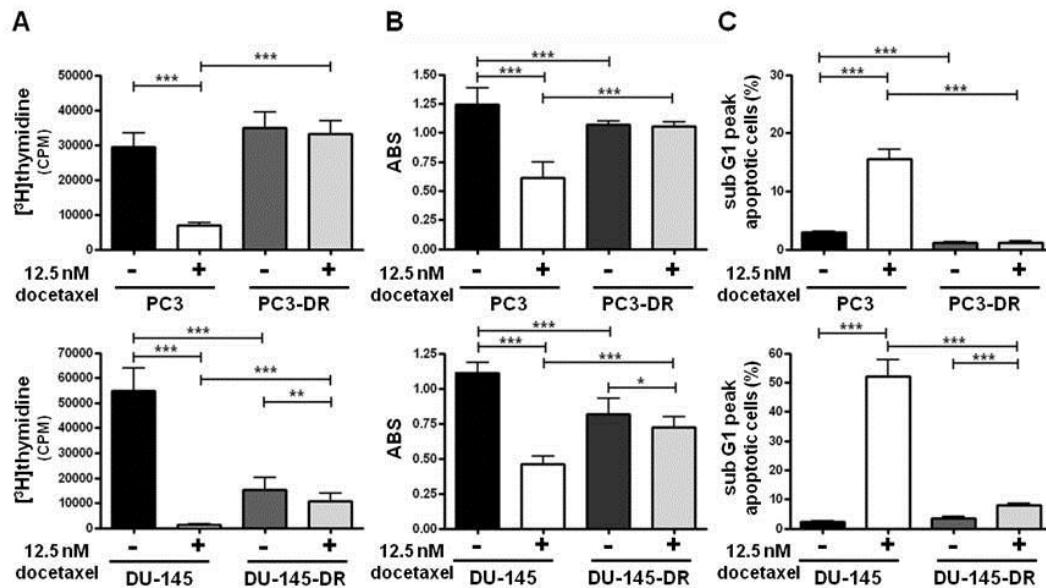


Figure 1. PC3-DR and DU-145-DR cells are less sensitive to docetaxel. Measurement of proliferation (**A**) and cell viability (**B**) in parental and docetaxel resistant PC3 and DU145 cells. Cellular proliferation was assessed by measurement of [³H]thymidine incorporation. Cell viability was determined by MTT assay. (**C**) Confirmation of reduced cell viability. The percentage of apoptotic cells was assessed by flow cytometry following propidium iodide staining. The results represent mean values + SEM from at least 3 independent experiments (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p< 0.001).

Abschlussberichte

In contrast, PC3-DR cells showed no change in the apoptosis rate (1.13% to 1.15%) and in DU-145-DR cells there was a slight increase in the percentage of apoptotic cells (3.49% to 8.01%). In addition, cell morphology in cells with acquired docetaxel resistance was changed (Figure 2), whereby docetaxel resistant cells were typically smaller than their parental counterparts and displayed a more elongated shape.

This change in cell morphology was a result of an Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) during the selection process with docetaxel. This was a surprising discovery at the beginning of the project and Dr. Puhr focused to investigate the consequences of this EMT for docetaxel resistance.

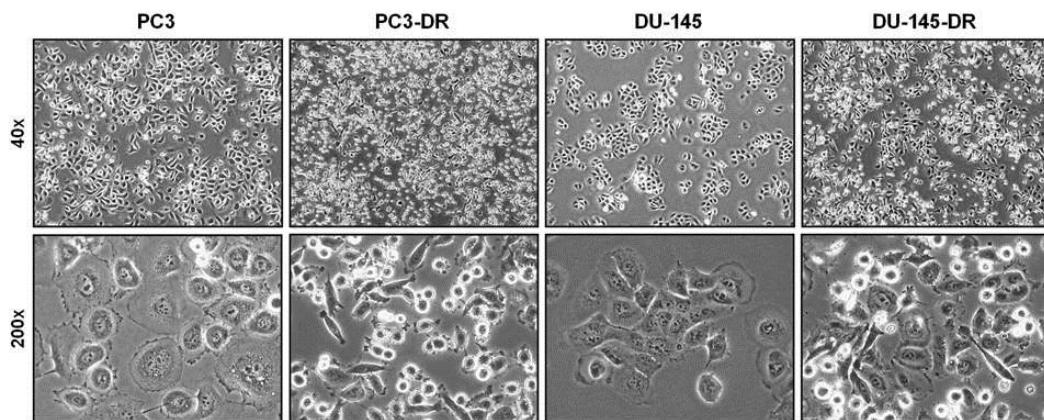


Figure 2. Docetaxel resistant cells have a different cell morphology compared to parental cell lines (magnification 40x and 200x).

This research resulted in one important publication in the American Journal of Pathology with the title ***“Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205.”***

Manuscript abstract:

Docetaxel resistance is the main reason for chemotherapy failure in different types of cancer. To uncover key mechanisms of docetaxel insensitivity in prostate cancer we have established docetaxel resistant sublines. In this study, we report that docetaxel resistant cells underwent an epithelial to mesenchymal transition during the selection process, leading to diminished E-cadherin levels and up-regulation of mesenchymal markers. Screening for key regulators of an epithelial phenotype revealed a significantly reduced expression of miR-200c and miR-205 in docetaxel resistant cells. Transfection of either microRNA resulted in re-expression of Ecadherin. Functional assays confirmed reduced adhesive as well as increased invasive and migratory abilities.

Furthermore, we detected an increased subpopulation with stem cell-like properties in resistant cells. Tissue microarray analysis revealed a reduced E-cadherin expression in tumors after neoadjuvant chemotherapy. Low E-cadherin levels could be linked to tumor relapse. The present study uncovers epithelial to mesenchymal transition as a hallmark of docetaxel resistance. Therefore, we suggest that

this mechanism is at least in part responsible for chemotherapy failure with implications for the development of novel therapeutics.

PIAS1 expression in docetaxel resistant cells (unpublished data):

Results for Aim 1:

In a direct comparison Dr. Puhr evaluated PIAS 1 mRNA and protein expression in parental and docetaxel resistant cell lines (Figure 3A). Elevated PIAS 1 expression in docetaxel resistant cells was confirmed by immunhistochemistry and immunofluorescence staining (Figure 3B, C, D)

Functional experiments proofed that PIAS 1 down-regulation for a prolonged time resulted in a significant decrease in proliferation, cell viability and in increased apoptosis in parental as well as in docetaxel resistant cells. (Figure 4A, B, C). Over-expression of PIAS 1 mutant plasmids confirmed a significant increase in apoptotic cells. Moreover, PIAS 1 down-regulation resulted in significantly reduced Mcl1 expression in docetaxel resistant cells (Figure 5).

On the basis of these results, the applicant hypothesizes that PIAS 1 may represent a potential target for improved therapeutic intervention in advanced and docetaxel resistant prostate cancer.

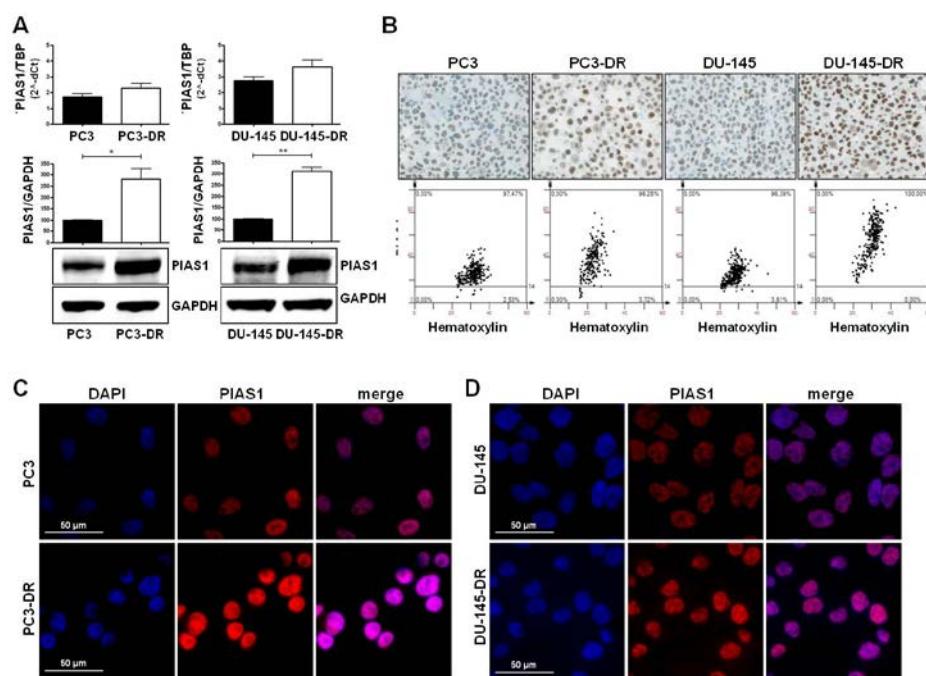


Figure 3. (A) Evaluation of PIAS 1 mRNA and protein expression in parental and docetaxel resistant cell lines. **(B)** Immunhistochemistry staining for PIAS 1 protein. **(C, D)** Immunofluorescence staining confirms an increased PIAS 1 protein expression in docetaxel resistant cells (magnification 40x).

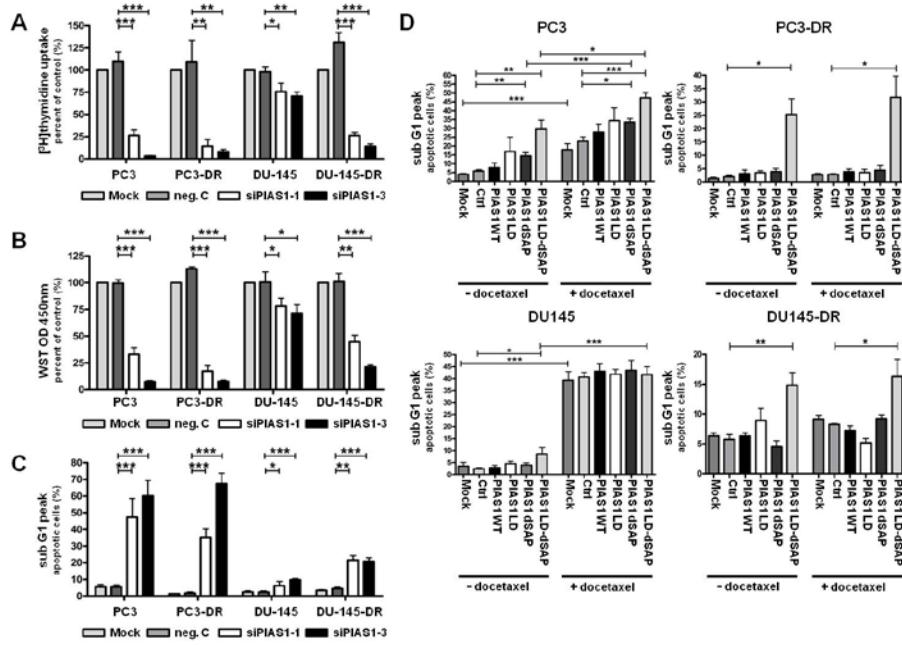


Figure 4. (A, B, C) Evaluation of proliferation, cell viability, and apoptosis after PIAS 1 down-regulation in parental and resistant cells. **(D)** Over-expression of non-functional PIAS1LD-dSAP mutated protein results in increased apoptosis.

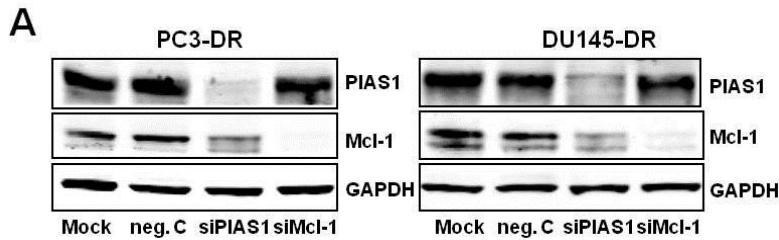


Figure 5. (A) Down-regulation of PIAS 1 leads to significant reduced Mcl1 expression.

BIRC5 and Mcl1 expression in docetaxel resistant cells (unpublished data)

Results for Aim 2:

Preliminary data revealed increased BIRC5 expression at both the mRNA and at protein level in malignant compared to benign prostate cell lines (Figure 6A). Furthermore, the applicant observed increased BIRC5 mRNA and protein expression in docetaxel resistant cells compared to their parental counterparts (Figure 6B, C). In view of the ability of BIRC5 to directly interact with the microtubule network, the applicant hypothesizes that increased expression of BIRC5 rescues docetaxel-resistant cells from undergoing apoptosis by antagonizing the effect of docetaxel.

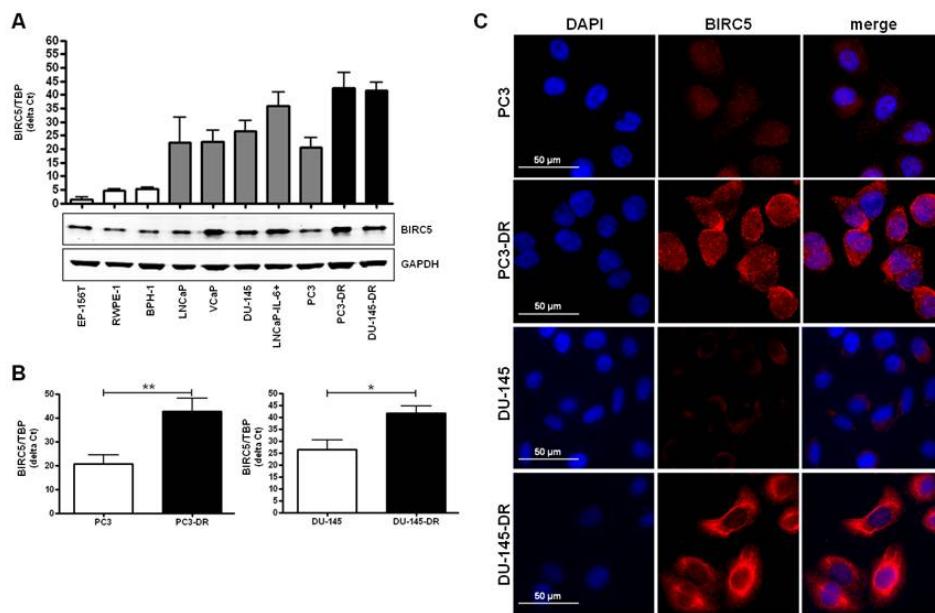


Figure 6. **(A)** Evaluation of BIRC5 mRNA and protein expression in different benign and malign prostate cell lines. **(B)** Docetaxel resistant cells have an increased BIRC5 mRNA expression compared to parental cells. **(C)** Immunofluorescence staining confirms an increased BIRC5 protein expression in docetaxel resistant cells (magnification 40x).

Preliminary data revealed also increased Mcl1 expression at protein level but not at mRNA level in docetaxel resistant cells (Figure 7A, B). Immunofluorescence staining confirms increased Mcl1 protein expression in docetaxel resistant cells (magnification 40x) (Figure 7C). This effect can be explained due to an increased Mcl1 protein stabilization. Nucleofractionation reveals in addition elevated Mcl1 levels in the cytoplasm as well as in the nucleus of resistant cells.

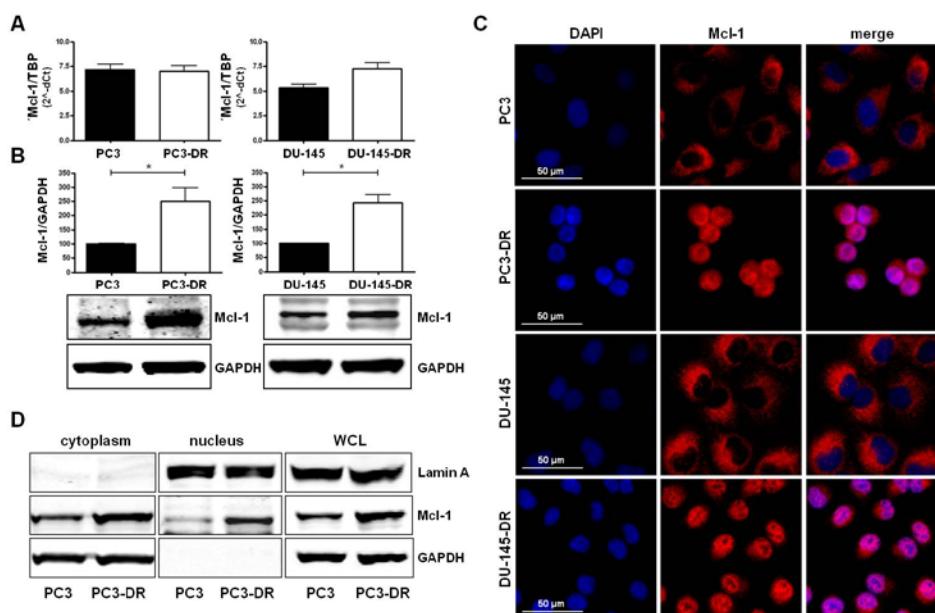


Figure 7. **(A)** Evaluation of Mcl1 mRNA and protein expression in parental and docetaxel resistant cells. **(B)** Docetaxel resistant cells have elevated Mcl1 levels compared to parental cells. **(C)**

Abschlussberichte

Immunofluorescence staining confirms an increased Mcl1 protein expression in docetaxel resistant cells (magnification 40x). **(D)** Mcl1 expression increases in the cytoplasm and in the nucleus in docetaxel resistant PC3 cells.

In summary, the presented results indicate that PIAS1, BIRC5 and Mcl1 might be promising novel targets to improve current therapies for advanced and docetaxel resistant prostate cancer. In an ongoing FWF project these proteins will be further investigated to reveal their functional significance in detail.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Puhr, Martin; Hoefer, Julia; Schäfer, Georg; Erb, Holger H H; Oh, Su Jung; Klocker, Helmut et al. (2012): Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. In: *The American journal of pathology* 181 (6), S. 2188–2201. (IF 4,591)

Hoefer, Julia; Kern, Johann; Ofer, Philipp; Eder, Iris E.; Schäfer, Georg; Dietrich, Dimo et al. (2014): SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. In: *Endocrine-related cancer* 21 (2), S. 175–187. (IF 4,805)

Massoner, P.; Thomm, T.; Mack, B.; Untergasser, G.; Martowicz, A.; Bobowski, K. et al. (2014): EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. In: *British journal of cancer* 111 (5), S. 955–964. (IF 4,836)

Puhr, Martin; Hoefer, Julia; Neuwirt, Hannes; Eder, Iris; Kern, Johann; Schäfer, Georg et al. (2014): PIAS1 is a crucial factor for prostate cancer cell survival and a valid target in docetaxel resistant cells. In: *Oncotarget* 5 (23), S. 12043-12056. (IF 6,359)

Externe Förderung

Successful FWF grant application. Project number P25639-B19; Functional significance of PIAS1 and BIRC5 in docetaxel resistant prostate cancer; Funds: EUR 337.233,75

Sonstiges

Nationale & Internationale Präsentationen

21st meeting of the EAU Section of Urological Research, Dresden, Germany 2013

46. Alpenländisches Urologensymposium; Arlberg, Austria 2013

20th meeting of the EAU Section of Urological Research; Strasbourg, France 2012

Drug target analysis in the pulmonary orphan disease pulmonary arterial hypertension

Dr. med. Katharina Cima

Universitätsklinik für Innere Medizin I-Abteilung für experimentelle Pneumologie

1 Antragsperiode

Berichts/Förderzeitraum: 15.04.2011-14.04.2013

Zusammenfassung

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is still incurable and thus a life threatening disease. The sustaining elevated pressures in the lung are currently believed to be caused by mechanisms such as vasoconstriction, vascular remodelling and thrombotic formations that occur due to impaired regulation of pulmonary artery endothelial cells (PaEC), pulmonary artery smooth muscle cells (PaSMC) and endothelial progenitor cells (EPC). As the pathophysiological mechanisms of PAH quite resemble those occurring in cancer, one new approach focuses on antiproliferative and proapoptotic agents that target receptor kinases. One major aspect of the project was to learn the to-date most common PAH animal model at one of the leading pulmonary research institutes, the ECCPS in Gießen, Germany, funded by a Short Term Research Fellowship of the European Respiratory Society with the aim to establish it at the Medical University of Innsbruck.



Fig. 1 Isolation of PaSMC, PaEC from monocrotaline and healthy rats.

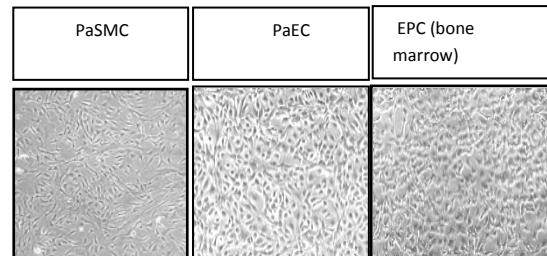
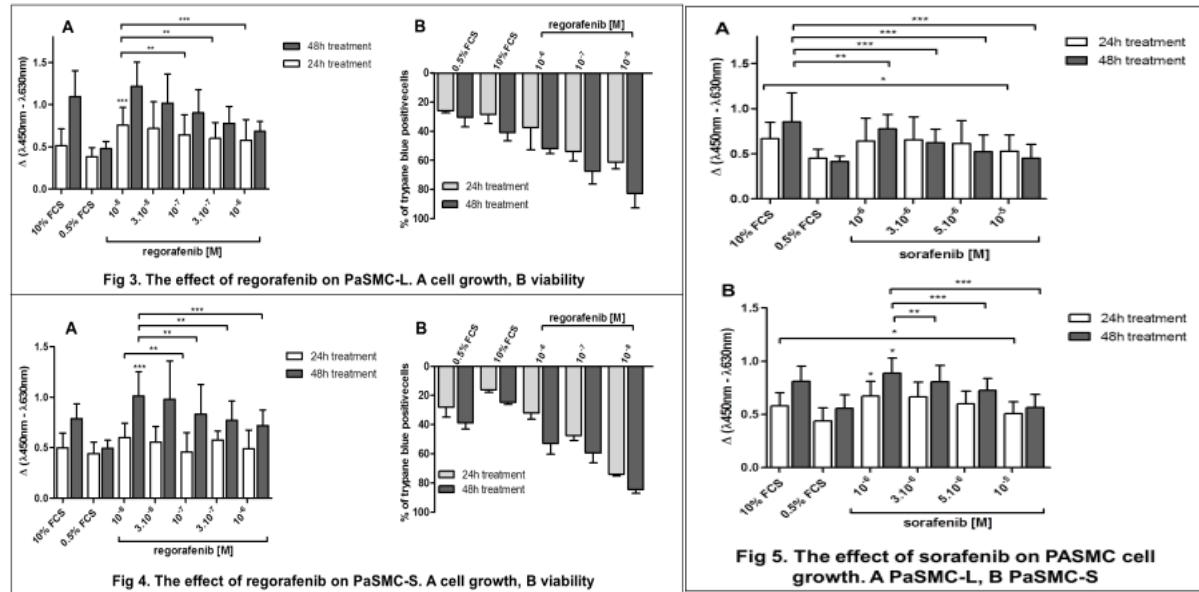


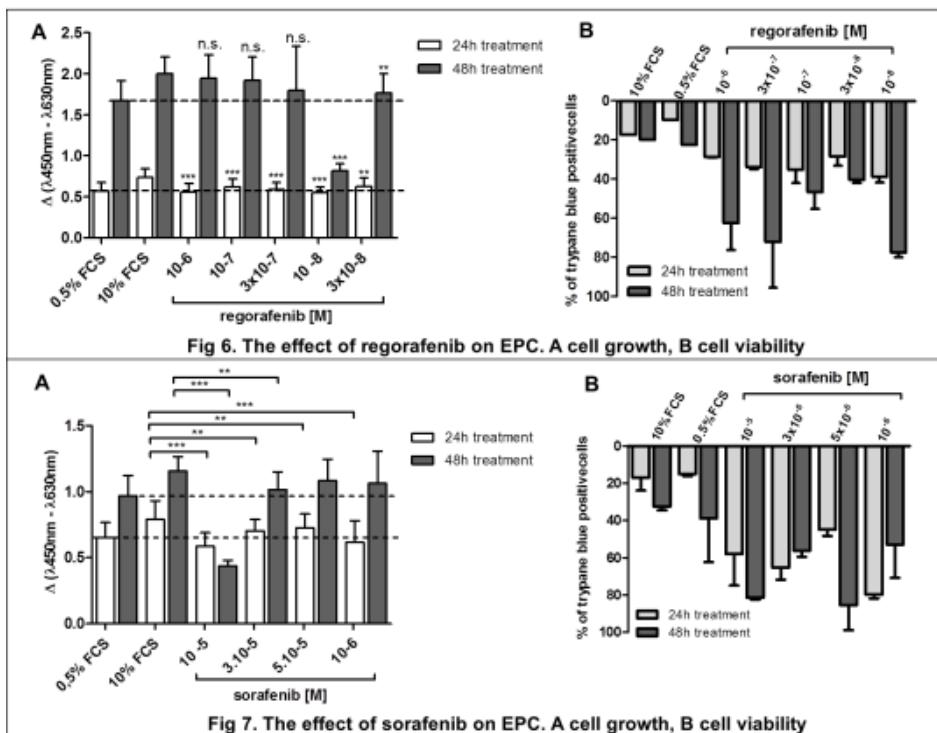
Fig. 2 culture of PaSMC, PaEC and EPC

For the first time, EPC of MCT rats could be isolated, the protocol for PaEC isolation could be enhanced and finally, cell cultures of EPC, PaEC and PaSMC could be established, as shown in Fig. 1.

Sorafenib [10^{-5} M] showed to inhibit cell growth of EPC and SMC most significantly ($p<0.0001$). Interestingly, the effects of sorafenib and regorafenib did not vary between small and large pulmonary artery SMC. Furthermore, the mitochondrial activity of PaSMC seems upregulated upon low regorafenib concentrations. (Fig. 3, Fig. 4)



The trypan blue assay also revealed both substances to affect cell viability. (The effect of sorafenib shown in Fig. 5) Regorafenib treatment of EPC revealed a viability of 22.5 to 37%; by contrast, sorafenib displayed an EPC viability of 15 to 48%. Furthermore, PASMC of small and large vessels displayed a growth arrest upon treatment, the viability ranging between 25-50%. (Fig. 6, Fig.7)



In the course of the project international early clinical trials revealed in PAH patients and cancer patients severe adverse events to tyrosine kinase inhibitors such as applied in this project, e.g. subdural hematoma and heart insufficiency which inflicted all the scientific projects aiming at launching tyrosine kinase receptor inhibitors as new treatment agents for PAH, leading -among other things- to the halt of this project as the focus in developing new drug targets for PAH has now switched to other pathways

e.g. the analysis of the p38MAPK pathway. Nevertheless, MUI funding of this project enabled the implementation of the PAH rat model and the cell isolation and culture of the pulmonary vasculature at the Medical University of Innsbruck apart from strengthening the cooperation with the ECCPS, Gießen, Germany. To conclude, by the project all prerequisites and skills could be obtained to analyze drug targets in the pulmonary orphan disease PAH at the MUI as the demand for new drugs has yet to be met.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

The heme oxygenase-1 system and long-term organ graft survival-"tolerance"

ao. Univ.-Prof. Dr.med.univ. Robert Öllinger

Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.04.2011 – 31.03.2013

Zusammenfassung

Hintergrund:

Die Organtransplantation ist der Goldstandard in der Therapie vieler Organerkrankungen im Endstadium. Dennoch sind immunsuppressive Medikamente beim transplantierten Patienten lebenslänglich notwendig. Diese Medikamente besitzen die Möglichkeit eine große Anzahl von unerwünschten Arzneimittelwirkungen auslösen zu können. Wie wir an einem Herztransplantationsmodell an der Maus zeigen konnten, ist es möglich Toleranz zu induzieren ohne der Gabe konventioneller Immunsuppressiva. Diese Toleranzentwicklung war in diesem experimentellen

Ansatz durch die Überexpression des Enzyms Häm-Oxygenase-1 möglich oder durch die Gabe von Bilirubin, eines seiner Metaboliten. In beiden experimentellen Ansätzen war die Transfusion Spender-spezifischer Leukozyten (DST) notwendig um Toleranz zu induzieren. Bisher ist nicht viel bekannt über den Mechanismus hinter der Spender-spezifischen Zelltransfusion (DST). Somit untersuchen wir im aktuellen Projektansatz wie DST zusammen mit der Induktion von HO-1 die Expression der Zytokine verändert.

Methoden:

Resveratrol als potentieller HO-1 induktor wurde oral verabreicht zusammen mit einer i.v. Einzelgabe von DST (20×10^6 Milzzellen gewonnen aus dem Spenderstamm) nach Herztransplantation an der Maus (BALB/c auf C57Bl/6, je Gruppe n=5). Resveratrol wurde zweimal täglich für eine Periode von 14 Tagen verabreicht. Die Transplantatfunktion wurde täglich durch Palpation evaluiert. Zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation (1, 3 5 p.o. Tag) wurden die Transplantat, die Milz- und Lymphnotenproben entnommen und mittels PCR auf IL-6, IL-10, TNF- α und HO-1 untersucht. Als House-keeping Gen wurde HPRT verwendet. Statistische Analysen wurden mittels Graphpad Prism5 statistisch ausgewertet.

Fortschritte:

Transplantatüberleben

DST ist eine potentielle klinische Strategie um Toleranz wie am Mausmodell auch am Menschen zu induzieren. In unserem Ansatz verlängerte DST das Transplantatüberleben signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zum Ansatz von Yamashita et al. konnte in unserem Versuchansatz durch die zusätzliche Gabe eines HO-1 Induktors (Resveratrol anstatt von CoPP) keine Verbesserung im Transplantatüberleben erreicht werden.

Resveratrol erreichte in keiner der beiden Dosierungen (10 bzw. 30mg/kg KG) einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der alleinigen DST-Gabe.

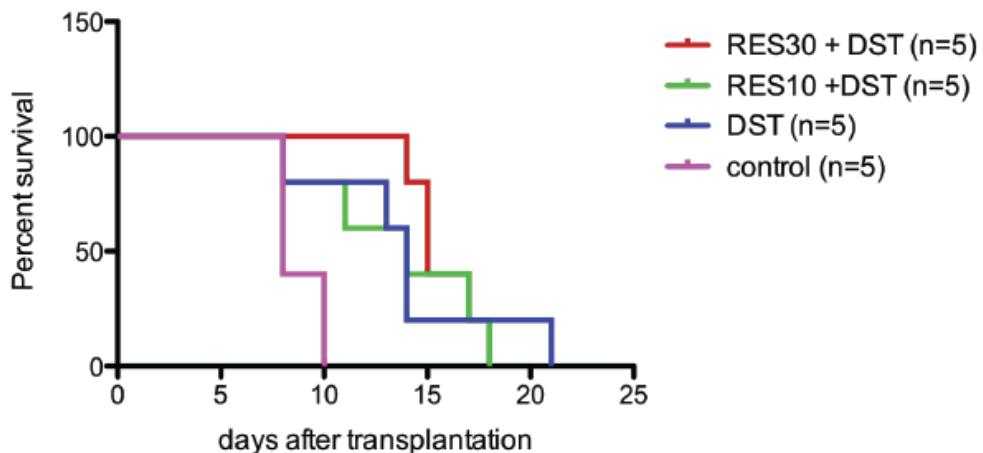
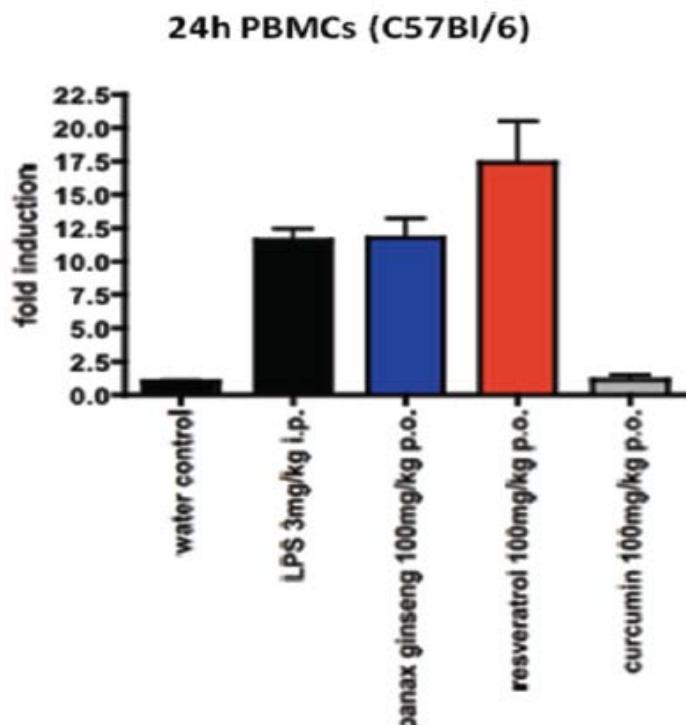


Figure1:Kaplan Meier curve of allogenic transplanted rodent hearts from Balb/c to C57Bl/6: Recipients treated with donor specific transfusion on day zero showed significant better mean graft survival (14 +/- 6 days vs. 9 +/- 1 days; p=0,02). Additional application of Resveratrol had no significant influence on graft survival(15 +/- 1 days & 14 +/- 4/- 6 days)

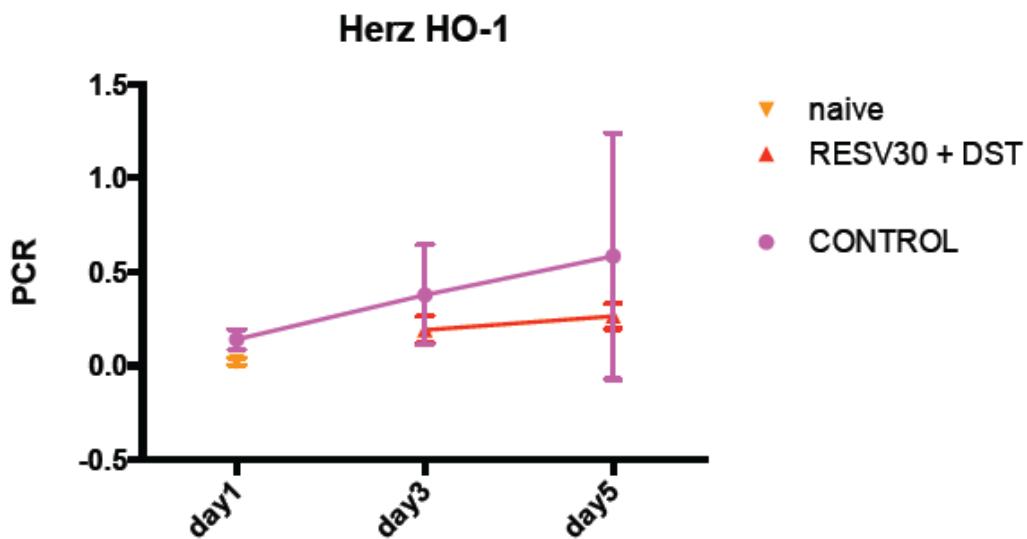
Expressionsprofil

Die Gabe einer Spender-spezifischen Transfusion zum Zeitpunkt der Transplantation würde für klinische Situationen leicht anwendbar sein. Yamashita et al konnte an einem ähnlichen allogenen Mausmodell zeigen, dass die Induktion mittels CoPP das Transplantatüberleben signifikant verlängert. In unserem experimentellen Aufbau, konnten wir zeigen, dass Resveratrol im Gegensatz zu weiteren potentiellen HO-1 Induktoren das Enzym HO-1 im C57Bl/6 Mäusestamm am deutlichsten induziert.

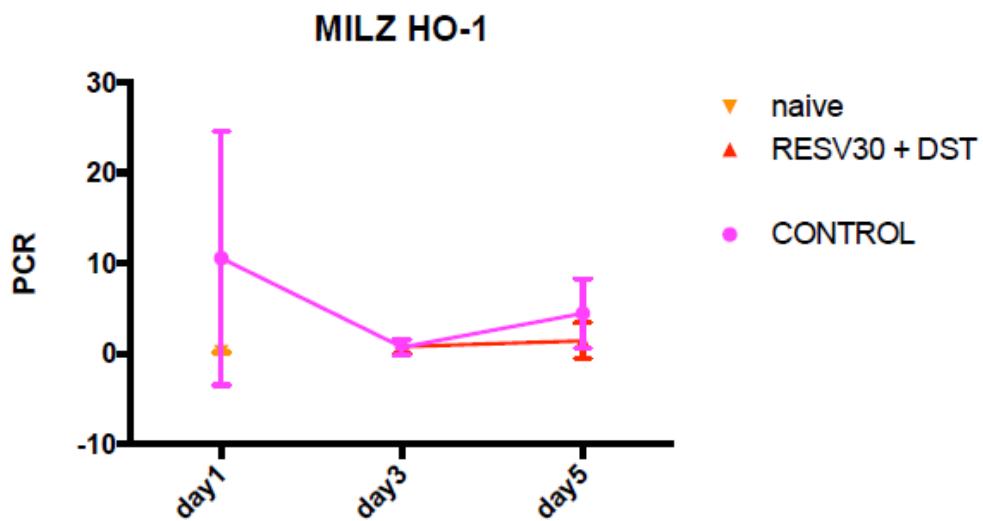


Dennoch konnte DST mit der zusätzlichen Gabe eines potentiellen HO-1 Induktors das Transplantatüberleben nicht wesentlich verlängern.

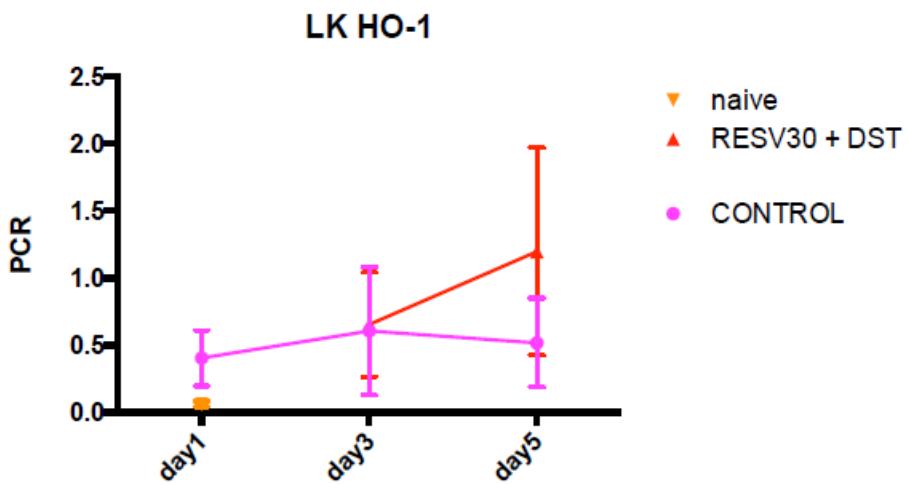
Wie wir im postoperativen Verlauf zeigen konnten, wird HO-1 durch den Stress der Transplantation hochreguliert. Im Vergleich dazu, zeigte die Gabe von DST und Resveratrol keinen weiteren Anstieg der HO-1 Induktion im Transplantat am 3. und 5. postoperativen Tag.



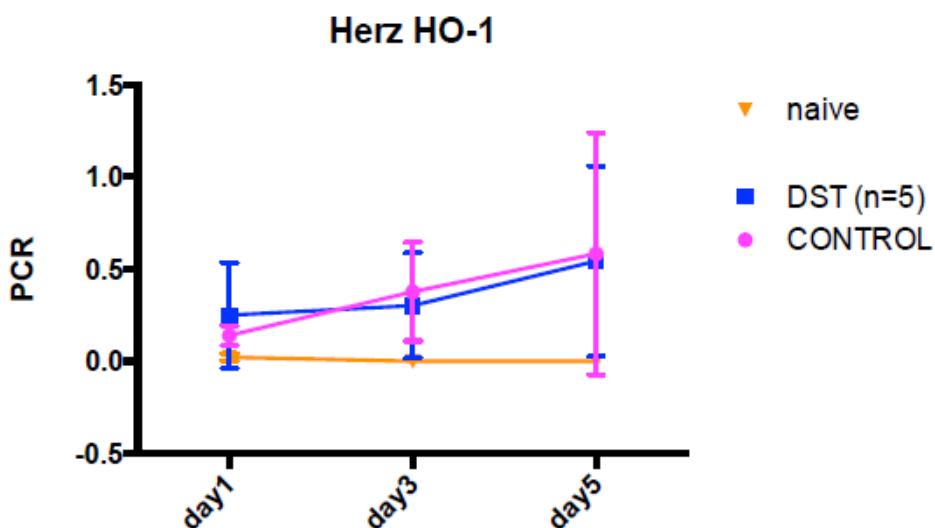
Ähnliche Effekte konnten wir an dem immunologischen Empfängerorgan, der Milz, nachweisen.

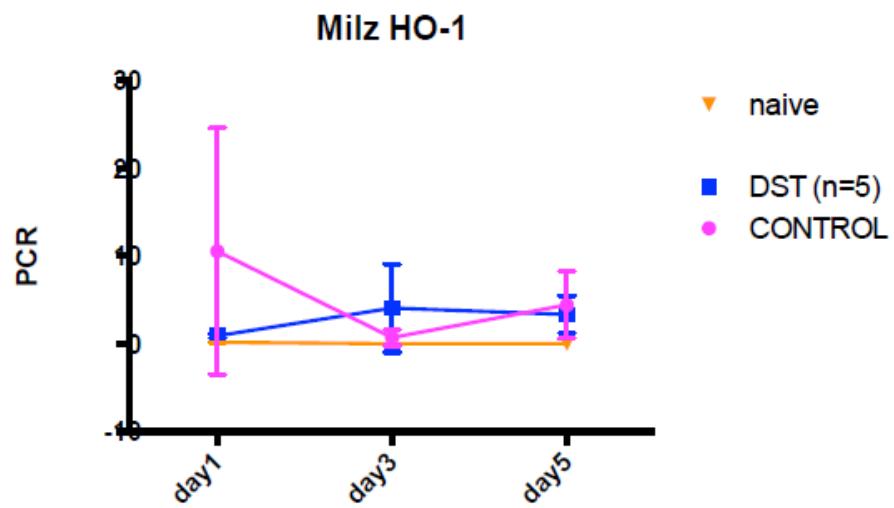


Im Gegensatz dazu zeigten die Empfänger-Lymphknoten am Tag 3 und 5 einen tendenziellen Anstieg der HO-1 Expression.



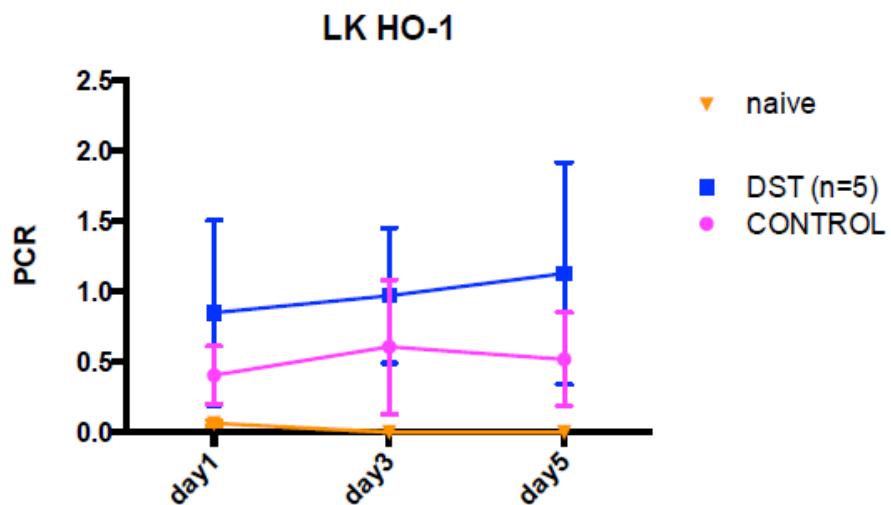
Dennoch konnte in der Überlebenskurve kein weiterer Erfolg hinsichtlich Transplantatüberleben durch die Kombination von DST und Resveratrol im Vergleich zur Gabe von Resveratrol allein erzielt werden. Mögliche Erklärungen liegen in einer womöglich falsch gewählten Galenik der Resveratrol-Zubereitung oder einer falschen Dosierung von Resveratrol. Wie wir in einem Nierenklemmmodell an der Ratte zeigen konnten ist nicht nur die Höhe der Induktion der HO-1 entscheidend für die Funktion des Organs, sondern auch die richtige Menge an Induktion der HO-1. Vergleicht man die DST-Transfusion mit der Kontrollgruppe so konnten wir zeigen, dass beide Gruppen eine ähnliche Transplantat HO-1 Induktion wie auch Expression in der Milz aufweisen.





Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass DST allein im Empfänger-Lymphknoten tendenziell an allen 3 postoperativen Tagen eine höhere HO-1 Expression aufweist.

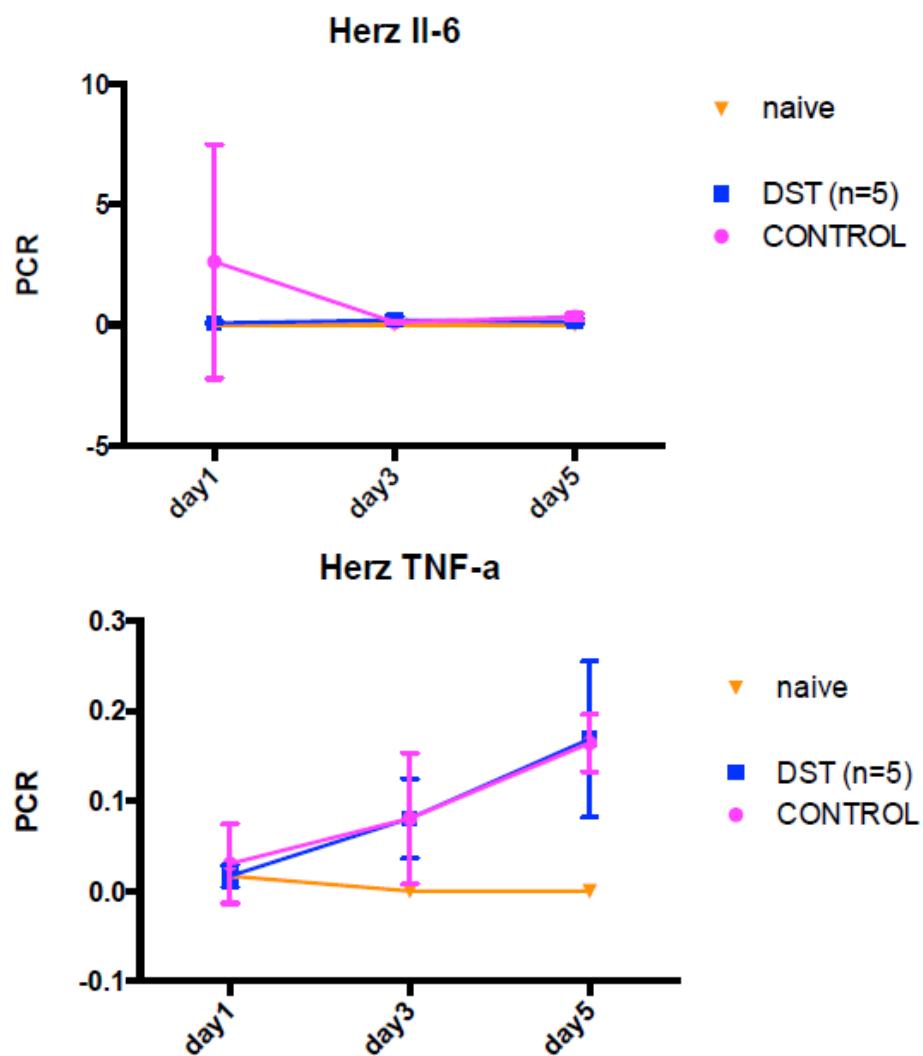
Somit zeigt hier sich ein ähnliches Expressionsmuster wie schon durch die Gabe von Resveratrol und DST gemeinsam.



Entzündungsmediatoren und akute Abstoßung

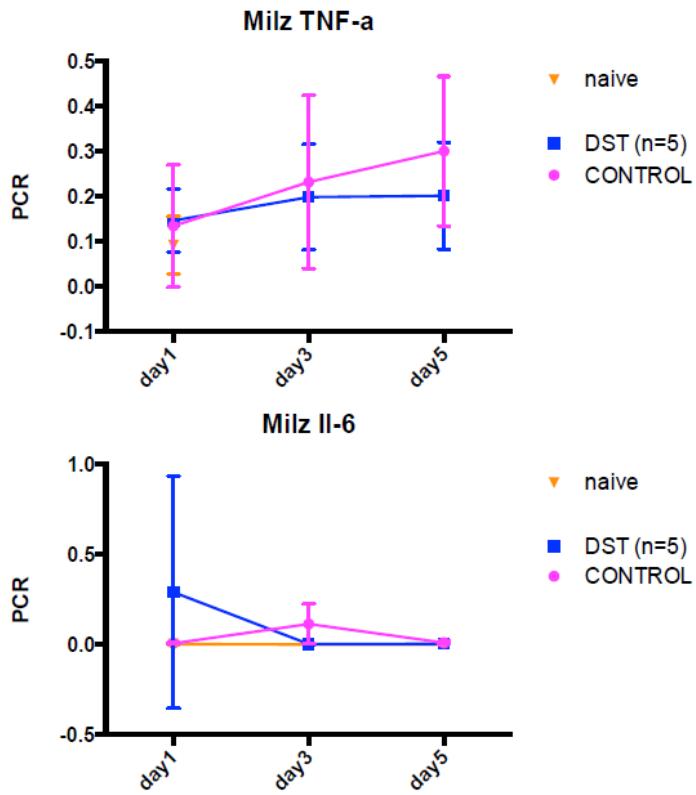
Durch die Gabe von DST konnte in unserem Versuchsaufbau die akute Abstoßung zeitlich verzögert werden. Doch wie war das Zytokinprofil postoperativ hinsichtlich endogener Pyrogene?

Im Transplantat zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Zytokine IL-6 und TNF-alpha.

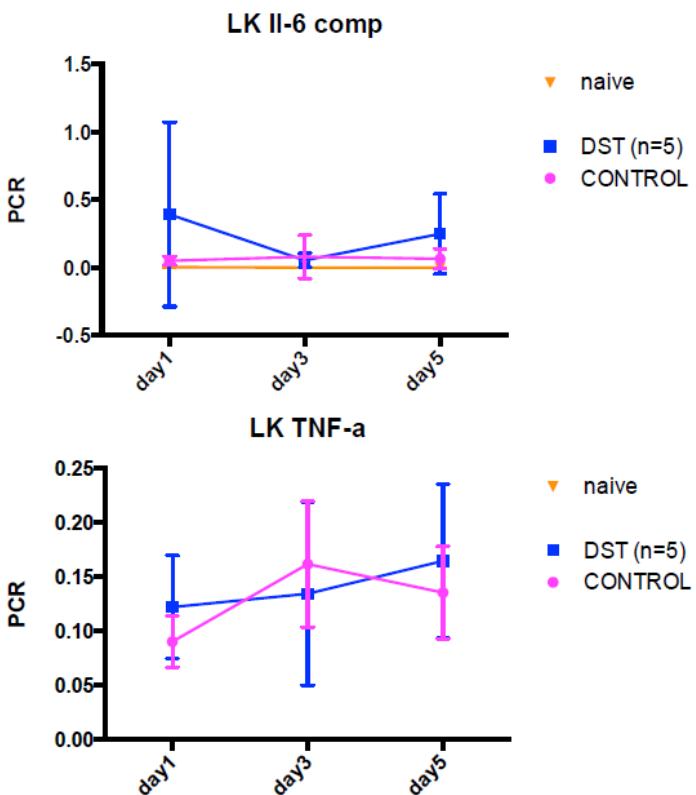


Abschlussberichte

In der Milz des Empfängers zeigte TNF-alpha und IL-6 keine Unterschiede in der Expression.

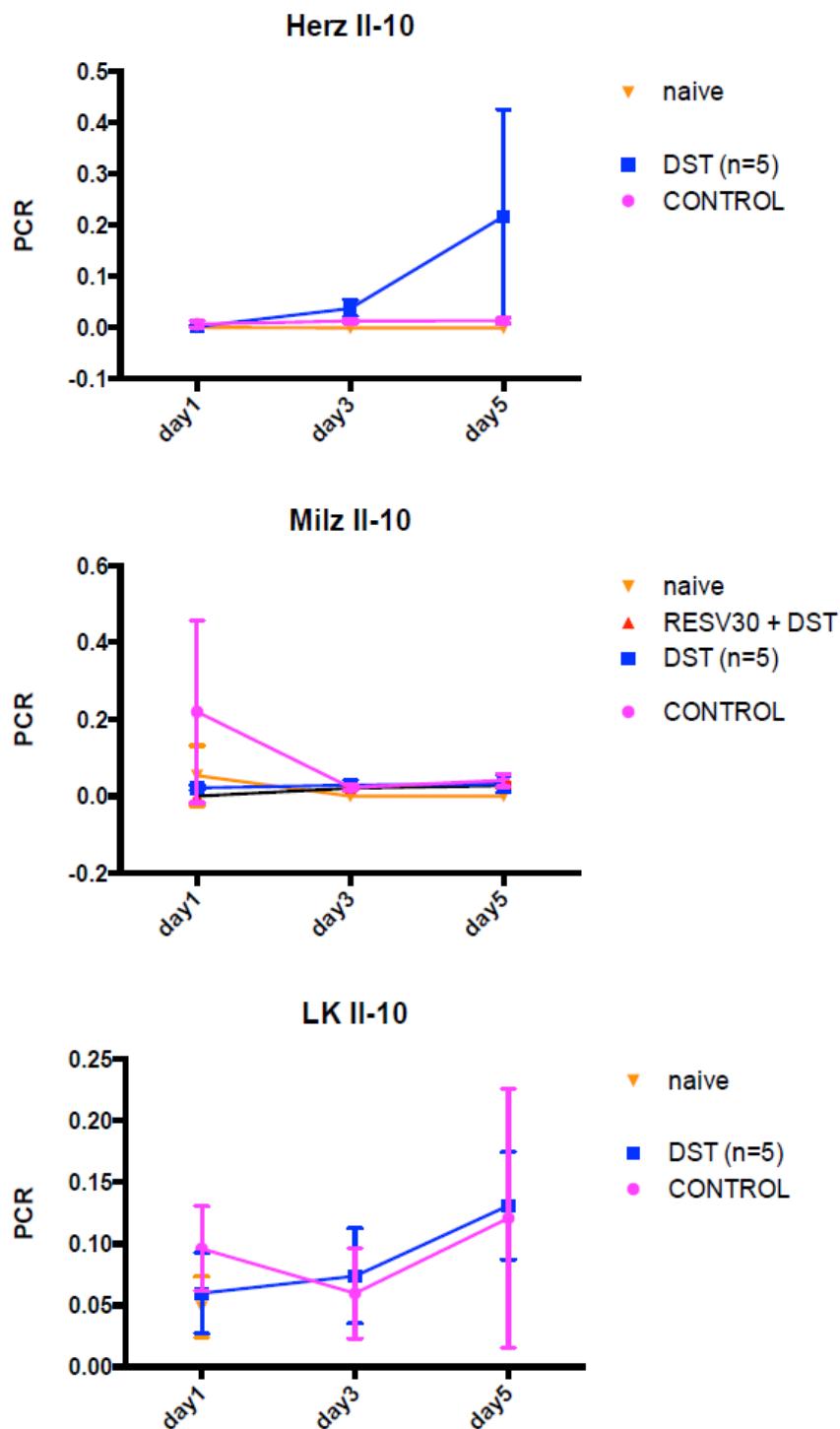


Ähnliche Expressionsmuster zeigten sich in den Lymphknoten des Empfängers.



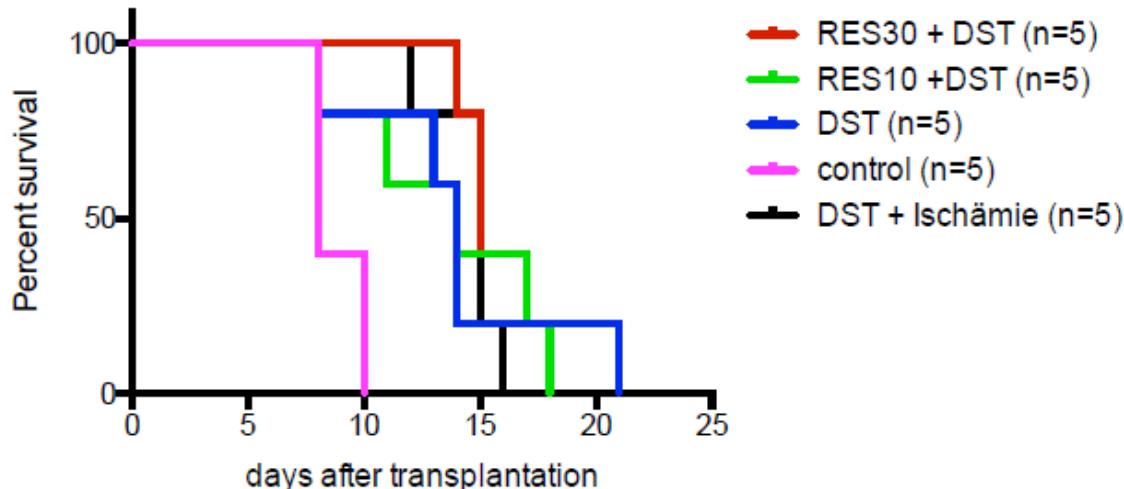
IL-10 zählt in höherer Expression als ein Zeichen für mögliche immunmodulatorische Effekte zur Toleranzinduktion.

In unserem experimentellen Aufbau konnten wir im postoperativen Verlauf keinen wesentlichen Unterschied im Expressionsmuster der Empfänger-Milz oder der Empfänger-Lymphknoten feststellen. Im Transplantat selbst zeigt sich am Tag 5 eine tendenzielle erhöhte Expression von IL-10



Weitere Fragen drehen sich um den Einfluss von Ischämie im gleichen experimentellen Setting.

Wie an der Überlebenskurve gezeigt werden konnte, verkürzt sich das Transplantatüberleben nach 6 Stunden Ischämie bei intraoperativer Transfusion von Spender-spezifischen Leukozyten nicht signifikant im Vergleich zur DST-Gruppe. Weitere Untersuchungen werden Aufschluss über das Expressionsmuster geben.



Konklusionen:

Unsere hohen Erwartungen, nämlich dass durch die Kombination von Spenderspezifischen Leukozytentransfusionen (DST) mit dem HO-1 Induktor Resveratrol durch Modifikation der Immunantwort das Transplantatüberleben verlängert wird, konnten in den durchgeföhrten Experimenten nicht bestätigt werden.

Eine Adjustierung der applizierten Resveratrolldosis führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse, im Gegensatz dazu konnten wir in einer parallel durchgeföhrten Untersuchungsreihe in einem Nierenarterienklemmmodell (Ischämie-Reperfusion) in der Ratte sehr wohl einen protektiven Effekt von Resveratrol beobachten. Wir vermuten daher, dass entgegen der Erkenntnisse aus früheren Untersuchungen, der Effekt der HO-1 Induktion im Transplantationsmodell vorrangig auf die Verhinderung des Ischämie-Reperfusionsschadens zurückzuföhren ist, nicht jedoch auf eine Modifikation der Alloimmunantwort. Weitere Untersuchungen, werden zeigen, ob die Einföhrung einer Ischämieperiode einen Einfluss auf die Ergebnisse mit und ohne HO-1 Induktion hat.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

Sonstiges

Die Daten werden an 2 Kongresse als Abstract submitted (Austrotransplant, Österreichische Gesellschaft für chirurgische Forschung).

A new role of caspase-2: partial rescue of p53 X-linked embryonic lethality by caspase-2 null mutation

Dr.rer.nat Claudia Manzl
Sektion für Allgemeine Pathologie

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.03.2011 – 28.02.2013

Zusammenfassung

Summary of obtained data and unexpected results:

In this study we used two different knock-out mouse models, both on a pure C57BL/6 background, i.e. p53^{-/-} and C2^{-/-}p53^{-/-} and characterized the gender distribution in adult mice as well as at two stages of embryonic development (E12.5 and E16.5-17.5) and compared it to wt controls. We aimed to address the question whether female embryonic lethality observed in C57BL/6 mice lacking p53 is modulated by loss of Caspase-2.

Initial publications analyzing mice deficient for p53 on a C57BL/6:129/Sv mixed genetic background reported normal embryonic development and viability of female and male offspring but noted higher susceptibility for spontaneous tumor formation at the age of about six months (Donehower et al., 1992). The frequency of p53^{-/-} offspring, when crossing two heterozygous C57BL/6:129/Sv animals, was reported to be 23% which fits with the expected Mendelian frequency. However, on a 129/Sv inbred background the percentage of p53-deficient mice in heterozygous breeding dropped to 17% indicating a more dramatic effect of p53-deficiency in inbred lines (Sah et al., 1995). Armstrong and colleagues reported significant developmental defects in female mice, predominantly affecting neural tube closure, in 129/Ola inbred but also mice in the progress of backcrossing onto BALB/c, SWR and C57BL/6 genetic backgrounds (Armstrong et al., 1995). Additionally, they noted a 50% decrease of p53-deficient females in segregates for BALB/c, SWR and 129/Ola that became even more prominent (84%) in 129/Ola inbred mice. In our studies using inbred C57BL/6 p53-mice, crossing p53^{-/-} males and heterozygous females we could only see 32.1% of p53^{-/-} progeny indicating also a stronger effect of p53-deficiency in inbred C57BL/6 compared to mixed background. Additional deletion of Caspase-2 resulted in comparable 33.4% DKO offspring indicating no significant impact of Caspase-2 on the overall frequency of p53-deficiency.

Taking a closer look at the gender distribution of p53^{-/-} mice, we noted that only 5% of all p53^{-/-} offspring were females, consistent with published observations (Armstrong et al., 1995).

More relevant, this “absence of females” of p53^{-/-} mice can be partially rescued with concomitant loss of Caspase-2 (15% of all C2^{-/-}p53^{-/-}). So, the loss of the most important tumor suppressor p53 leads to developmental defects affecting only females (Juriloff and Harris, 2000) but additional deficiency of Caspase-2 can counteract this, albeit only partially.

To check whether this rescue is due to general defects in developmental apoptosis on a p53-deficient background, we also investigated the gender distribution of another important player in cell death, Puma. In Puma^{-/-} mice, males and females occur with the same frequency.

Interestingly, lack of Puma cannot rescue p53-deficient females from embryonic/perinatal death as only 5% of all p53^{-/-}puma^{-/-} mice were females which correlates with the 5% females of p53^{-/-} mice. Together

Abschlussberichte

this data suggests an up to now unknown function of Caspase-2 in embryonic development, which suppresses embryonic lethality in a significant fraction of p53-deficient females.

To investigate the time-point of embryonic lethality, we analyzed two different stages of embryonic development – E12.5-13.5 and E16.5-17.5 – regarding gender distribution in wt, p53^{-/-} and C2^{-/-}p53^{-/-} mice. Because of comparable amounts of females and males at both embryonic stages in p53^{-/-} as well as C2^{-/-}p53^{-/-} embryos, we conclude that the event of death in females must be occurring later than E16.5-17.5, either perinatal or between birth and weaning. However, we did not note an increased loss of mice within the first 3 weeks of life, albeit loss around time of birth cannot be excluded. When we tried to analyze E19.5 embryos, we observed a shortened gestation period of p53- as well as DKO-breeding that leads to preterm delivery at E19-E19.5. This result is supported by studies of uterine-specific p53^{fl/fl} mice on a mixed background that show E19-delivery phenotypes because of post-implantation defects as a result of growth restriction and terminal differentiation of uterine decidual cells (Hirota et al., 2010). Mentionable, in our studies, females used for p53- as well as DKO-breeding both contained one functional allele of p53 and hence it seems that haploinsufficiency has already an impact on the duration of pregnancy in C57BL/6 mice. As an alternative explanation one could also speculate that preterm-birth might be a result of dead or dying embryos at very late stages of gestation although there are no such reports in the literature. In our latest studies focusing on E19 embryos displaying a very late stage in embryonic development, we observed female DKO embryos exhibiting exencephaly already starting to degenerate as the amniotic fluid was reddish and more viscous than non-affected DKO littermates (not shown). They were also smaller in size and littermates were able to breath when stimulated, but embryos with exencephaly were not, indicating that they already died *in utero*. However, studies comparing gestation periods of different inbred strains demonstrated a mean delivery day of C57BL/6 mice of 19.27 days showing that end of pregnancy at E19-E19.5 is normal and not an effect of p53-deficiency (Murray et al., 2010).

Neural tube defects, especially exencephaly, is a common phenotype observed in a variety of knock-out mouse models and was identified to be the major reason for embryonic lethality in p53-deficient female mice (Juriloff and Harris, 2000). The exhibition of exencephaly can only be observed in a subset of p53^{-/-} embryos on a mixed C57BL/6:129/Sv genetic background and the incidence was increased in 129/Sv inbred mice (Sah et al., 1995).

Exencephaly hence seems strictly a phenomenon observed in female p53^{-/-} mice on mixed and 129/Sv inbred background. In our analysis of C57BL/6 p53^{-/-} mice we could confirm the female bias, as 11/12 p53-deficient embryos exhibiting exencephaly were females.

Remarkably, 65% of all female p53^{-/-} embryos were not affected and therefore had no obvious phenotype, but still did not come to birth, or must have died perinatal. In embryos with a loss of both, Caspase-2 and p53 exencephaly was never observed in males and the frequency of exencephaly in females was only slightly decreased, but comparable to p53^{-/-} embryos, as 24% of females showed neural tube closure defects. Together this suggests that Caspase-2 does not alter the frequency of NTD but is involved in an “alternative” death mode sufficient to enhance the frequency of DKO female animals. Furthermore, exencephaly seems not to be the major event responsible for female embryonic lethality in mice deficient for p53.

However, p53^{-/-} females as well as C2^{-/-}p53^{-/-} females coming to birth show a mild phenotype compared to wt. Their overall size and weight is slightly decreased when compared to wt and reflected in a

decrease of tail diameter compared to littermate females. Further studies are required to investigate this issue, so at the moment we cannot say whether these changes are a result of caudal NTD, skeletal malformations or something else.

Furthermore, the general viability appears increased in female mice double-deficient for Caspase-2 and p53, when compared to p53^{-/-} females, pointing to an oncogenic function of Caspase-2 in females lacking p53. However, as only three p53^{-/-} and seven DKO females were available for comparison and male DKO mice do not differ in their tumor incidence from p53^{-/-} mice (unpublished data) these results seem simply too preliminary to draw any conclusions. Of note, neither p53^{-/-} nor DKO females became pregnant, with the exception of one DKO-female that once was observed to have dead embryos in the cage. This observation suggests a so far overlooked role for p53 in the process of female fertility. Future experiments, like ovary or uterine horn isolation might give us insights in the problems of p53^{-/-} females concerning pregnancy and delivery. However, they do not show vaginal aplasia as observed frequently in Bim^{-/-} and Bim^{-/-}Bmf^{-/-} mice (Hubner et al., 2010), (own observations).

At the beginning of our studies none of the p53^{-/-} mice was female (0/95 in 2010-2011) which changed in 2012 where 7/44 (15.9%) p53^{-/-} mice were females. In contrast, 9/54 (16.7%) DKO mice in 2010-2011 and 6/48 (12.5%) DKO mice in 2012 were females. Therefore, we cannot rule out that genetic drift in our colonies is the reason for the accumulation of liveborn female p53^{-/-} mice in 2012, although both, Caspase-2 as well as p53 knockout mice were held on pure C57BL/6 genetic background before crossing this two models to get double knock-out mice. So, the rescue effect of additional Caspase-2 deletion was much more striking (0% p53^{-/-} female vs. 16.7% DKO female) when we started the work. So, in 2010-2012 5% of all p53^{-/-} mice are females and 14.7% of all DKO-mice are females which is still a nearly 3x increase in females.

The formation of the neural tube is orchestrated by a plethora of genes and studies defined more than 200 genes, when deleted or non-functional causing neural tube defects (Copp and Greene, 2009). Nevertheless, in our studies we identified that more than two-thirds of p53^{-/-} female embryos and even three-fourths of C2^{-/-}p53^{-/-} female embryos were not affected by neural tube defects and therefore should be viable. However, the majority of them still died between E16.5-17.5 and weaning indicating a developmental defect beside NTDs responsible for female death. Therefore, we aimed to check expression pattern of genes involved in apoptosis, neural tube formation and p53-control. One of the most promising results we observed was the expression of Bmp2-mRNA in the fetal brain. Bmp2 is only slightly increased in C2^{-/-}p53^{-/-} when compared to wt females, but significantly upregulated in p53^{-/-} females at E12.5-13.5. So, increased Bmp2-levels in p53^{-/-} females could cause malformations that do not occur with concomitant loss of Caspase-2, since it is known to be a morphogen and therefore acts in a dose-dependent manner (Castranio and Mishina, 2009).

Therefore, Caspase-2 might somehow enhance Bmp2 expression when p53 is missing, an effect which is abrogated, resulting in an almost wt-like Bmp2 expression in DKO embryos.

More strikingly, quite contrary to the increased expression of Bmp2 in females, mRNA-levels are significantly decreased in p53^{-/-} males which are known to be unaffected by embryonic lethality at all, indicating males can better cope with the situation of p53-deficiency. As Bmp2 is required for neural tube formation and neural crest cell migration, loss of Bmp2 leads to embryonic lethal NTD at E9.5 (Correia et al., 2007). In contrast, hyper-activation of Bmp2 might also influence dorsal patterning which is mediated by Bmp2, because of altered dosedependent cell identity and extended migration of neural crest cells (Castranio and Mishina, 2009). Higher Bmp2-levels could also inhibit more efficiently neural

Abschlussberichte

fate and promote epidermal induction together with bmp7 (Suzuki et al., 1997) and brain development in general might also be affected, as high Bmp2-levels lead to changes in the cell fate of neuronal progenitors from neuronal to astrocytic commitment (Nakashima et al., 2001). At a later stage (E16.5-17.5) Bmp2-levels are at similar levels than at E12.5-13.5 in females with no differences between C2^{-/-} p53^{-/-} and exencephalic C2^{-/-}p53^{-/-} embryos, indicating also an impact of Bmp2 at a late stage in embryonic development when p53 is missing, but not when Caspase-2 is additionally absent.

Another candidate with an altered expression between females and males at E16.5-17.5 is the transcription factor Pax3. Similar to Bmp2-deficient mice, pax3^{-/-} (splotch) embryos die because of apoptosis-associated NTD (Pani et al., 2002). Pax3 is significantly upregulated in p53^{-/-} females, but down-regulated in females with an additional loss of Caspase-2, indicating an increased survival of DKO females because of a wild type like expression pattern of Pax3.

Downregulation of Pax3 in p53^{-/-} males unaffected by NTD therefore confirm the assumption that enhanced Pax3 mRNA-levels in p53^{-/-} females may contribute to the developmental problems as Pax3 acts as a transcription factor controlling numerous genes during development. Down-regulation of Pax3 activity might be beneficial for avoiding NTD as it was shown that loss of p53 can rescue splotch mutant NTD, embryonic lethality and also defective neural crest cell migration (Morgan et al., 2008). Though, Pax3 does not transcriptionally regulate neural tube closure, but inhibits p53-dependent apoptosis which is needed for proper fusion of the developing neural tube, however, it can still inhibit p53 killing by transcription of antiapoptotic genes (Wang et al., 2011). So, in a p53-deficient environment, p53 independent cell death may take place that is no longer blocked by Pax3 action. However, this may be blocked by lack of Caspase-2.

At the protein level we could not detect enhanced apoptosis in the fetal brain when p53 (or additionally Caspase-2) is missing, neither at an early stage (E12.5-13.5), nor at a later stage (E17.5-18.5) of embryonic development. PARP-cleavage could only be detected in wt E17.5-18.5 embryos indicating that loss of p53 is sufficient to block this apoptosis. However, the pro-form of PARP should be detectable in all the genotypes, but is absent in E12.5-13.5 and adult wt mice. Furthermore, contradictory, cleavage of Caspase-3 that is also an indicator of ongoing apoptosis within a cell, was only slightly be detected in C2^{-/-}p53^{-/-} embryos independent of exhibiting exencephaly, but not in wt or p53^{-/-} embryos at E17.5-18.5.

Mentionable, in a living organism apoptotic cells are quickly removed and therefore maybe not so easy to detect compared to cell culture. When separating forebrain (FB) and hindbrain (HB) to check whether there are any local changes in protein expression we could not find striking differences in genes involved in neural tube regulation (Notch1, Numb), only that generally proteins are slightly higher expressed in HB except for Notch1 in C2^{-/-}p53^{-/-} embryos.

Together these data suggest that loss of Caspase-2 can rescue a portion of p53^{-/-} females from embryonic lethality that are unaffected of NTD, and though would die due to an “alternative” death mode, therefore resulting in a higher number of adult DKO females.

Reasons are still unclear and therefore follow up studies are required to shed light on the exact function and role of Caspase-2 in female embryonic development on a p53-deficient background. Therefore, these results should be seen as preliminary, keeping in mind the very complex process of embryonic development and especially neural tube formation together with neural crest migration and

functionality of derivate cells, and that myriads of genes are orchestrated to result in a viable organism with a certain redundancy precluding easy identification of relevant target genes.

Referenzenliste

- Armstrong JF, Kaufman MH, Harrison DJ, Clarke AR (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* 5: 931-6.
- Castranio T, Mishina Y (2009). Bmp2 is required for cephalic neural tube closure in the mouse. *Dev Dyn* 238: 110-22.
- Copp AJ, Greene ND (2009). Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol* 220: 217-30.
- Correia AC, Costa M, Moraes F, Bom J, Novoa A, Mallo M (2007). Bmp2 is required for migration but not for induction of neural crest cells in the mouse. *Dev Dyn* 236: 2493-501.
- Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, Dey SK (2010). Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest* 120: 803-15.
- Juriloff DM, Harris MJ (2000). Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 9: 993-1000.
- Morgan SC, Lee HY, Relaix F, Sandell LL, Levorse JM, Loeken MR (2008). Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech Dev* 125: 757-67.
- Murray SA, Morgan JL, Kane C, Sharma Y, Heffner CS, Lake J et al (2010). Mouse gestation length is genetically determined. *PLoS One* 5: e12418.
- Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M et al (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5868-73.
- Pani L, Horal M, Loeken MR (2002). Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3-dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev* 16: 676-80.
- Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, Jacks T (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* 10: 175-80.
- Suzuki A, Kaneko E, Ueno N, Hemmati-Brivanlou A (1997). Regulation of epidermal induction by BMP2 and BMP7 signaling. *Dev Biol* 189: 112-22.
- Wang XD, Morgan SC, Loeken MR (2011). Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS One* 6: e29379.

Publikationen mit MUI-Start Erwähnung

- Manzl, C.; Fava, L. L.; Krumschnabel, G.; Peintner, L.; Tanzer, M. C.; Soratroi, C. et al. (2013): Death of p53-defective cells triggered by forced mitotic entry in the presence of DNA damage is not uniquely dependent on Caspase-2 or the PIDDosome. In: *Cell Death Dis* 4 (12), S. e942. (IF 5,014)

Abschlussberichte

Manzl, Claudia; Baumgartner, Florian; Peintner, Lukas; Schuler, Fabian; Villunger, Andreas (2013): Possible pitfalls investigating cell death responses in genetically engineered mouse models and derived cell lines. In: *Methods* 61 (2), S. 130–137. (IF 3,645)

Externe Förderung

Sonstiges

Arbeiten:

Bachelorarbeitskolloquium 2 (BAK6K), FHG Innsbruck, Bernadette Kogler (2011)

Master Thesis, LFU Studienzweig Molekularbiologie, Fabian Schuler (2013)

Kongressteilnahmen:

EMBO Workshop „Cycling to Death“, Obergurgel 23.01. – 27.01.2013. Posterpräsentation.

Therapeutic angiogenesis by the neuropeptide catestatin

Dr.med.univ. Markus Theurl
Universitätsklinik für Innere Medizin III

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 14.02.2011 – 13.02.2013

Zusammenfassung

Peripheral arterial disease (PAD) and coronary heart disease (CHD) represent an increasing medical burden in the western world. Both clinical entities are associated with progression of atherosclerosis and increased morbidity and mortality. Current therapeutic options are limited to pharmacological therapy, bypass surgery or percutaneous transluminal angioplasty (PTA) with or without stent implantation. Despite great advances in modern medicine, a large number of patients do not qualify for surgical or interventional procedures due to their co-morbidities and/or an unfavorable anatomical vessel situation. Life quality and expectancy of those patients is decreased and comparable to patients suffering from metastatic tumor disease. Therefore, this group of patients would need new therapeutic approaches in order to increase collateral blood flow to areas of decreased tissue perfusion.

Angiogenesis, the growth of new blood vessels from the pre-existing vasculature, is a process involved in many physiological as well as pathological processes like tissue ischemia, wound healing, diabetic retinopathy, cancer growth, inflammatory processes or the menstrual cycle. A variety of factors has been identified to mediate this process by inducing chemotaxis and proliferation of endothelial cells (EC) and to exert mitogenic effects on EC with vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) being the most prominent ones.

Experimental gene therapy studies in the field of critical limb ischemia (CLI) or myocardial infarction showed promising results demonstrated by improved ejection fraction and heart muscle remodelling or ameliorated hind limb blood flow recovery. Unfortunately, so far these promising results could not be testified in a human set up. Although safety of therapeutic angiogenesis could be demonstrated in several clinical studies in the field of myocardial infarction (VIVA and CAT) or intermittent claudication (RAVE and WALK) these studies failed to show beneficial effects as reduced amputation rate or long term survival¹¹⁻¹⁵.

Catestatin (CST) is a 21 amino acid neuropeptide derived from the precursor molecule Chromogranin A (ChgA). It is stored and released especially in the neuroendocrine system. Recently we could demonstrate that secretoneurin (SN), another neuropeptide, is up-regulated in ischemic skeletal muscle cells and exerts beneficial effects in the hind limb ischemia model by the induction of angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis by an endothelial nitric oxide synthase (eNOS) dependent mechanism and in a rat model of myocardial infarction we showed that SN improves cardiac function and stimulates several potent receptor tyrosine kinases for angiogenic cytokines like VEGF, FGF or insulin-like growth factor (IGF). Due to these results we hypothesized that also CST might have beneficial effects on endothelial cell function and might qualify as therapeutic agent for the treatment of ischemia related diseases. Indeed, we could show that CST induces chemotaxis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and stimulates in vitro angiogenesis. In the hind limb ischemia model treatment with the neuropeptide CST resulted in an increase of capillary and arteriole density

Abschlussberichte

and improved limb perfusion. The aim of this study was to clarify the mechanism behind and to investigate if CST also affects other vascular cells.

Important findings

Catestatin and vascular cells

We could show that CST activates a variety of signaling transduction pathways like Akt, ERK1/2 and eNOS in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human smooth muscle cells (SMC) and human coronary artery endothelial cells (CAEC). Inhibition of these signaling cascades was partially associated with abrogation of observed effects (e.g. chemotaxis, in-vitro angiogenesis, apoptosis). The Akt-eNOS signaling pathway for example has been shown to be crucial for the recruitment and incorporation of endothelial progenitor cells in animal models of coronary and hind limb ischemia. Moreover, our studies revealed that CST-treatment results in increased proliferation of human coronary artery endothelial cells. Similar to HUVEC the observed effect was diminished by co-incubation of cells with a basic FGF-antibody or a basic FGF-receptor blocker indicating involvement of this cytokine in CST-mediated actions. Interestingly, co-incubation of these cells with a VEGF-antibody had no effect.

Catestatin and diabetes

Since diabetes mellitus (DM) is one of the most important vascular risk factors and has been shown to dramatically impair endothelial cell function and the naturally occurring angiogenic response in the mouse HLI model resulting in a high rate of limb and toe amputation after this operation we investigated the therapeutic potential of CST under hyperglycemic conditions. As already observed in other experimental studies hyperglycemia diminished the cellular response regarding proliferation and in-vitro angiogenesis. Intriguingly, CST beneficially affected migration, proliferation and in-vitro angiogenesis of HUVEC even under diabetic conditions. The effects were comparable to vascular endothelial growth factor, which was used as positive control. Moreover, CST protected HUVEC from apoptosis under experimental hyperglycemia. To induce diabetes in C57BL/6 mice streptozotocin was injected intraperitoneally. Consequently mice underwent unilateral hind limb ischemia operation (ligation and excision of left femoral artery) and CST was injected intramuscularly every other day. The final immunohistochemical analysis revealed an increase of capillary and arteriole density by CST-treatment. In addition, as a kind of clinical parameter administration of CST was associated with a significant improvement of limb re-perfusion and a reduction of tissue defects and toe amputations in this model.

Conclusion

In summary, due to the data obtained within the funding period, we conclude that CST might be an agent of interest for the treatment of peripheral arterial disease. Future studies will clarify the therapeutic potential of CST for the treatment of experimental myocardial ischemia (FWF project P26251-B24). In addition, we plan to construct a gene therapeutic vector for CST. Therefore different delivery systems (e.g. plasmid, AAV-9 virus,...) will be tested.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

Due to the data obtained during the MUI START funding period a grant proposal was accepted by the Austrian Science Fund (FWF, P26251-B24).

Sonstiges

Press release with mention of the MUI START programme:

7.8.2013, MUI homepage, <https://www.i-med.ac.at/mypoint/news/675845.html>

Presentations:

- Dreiländer Tagung Angiologie 2013, Graz
- Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Basic Science Meeting 2013, Dresden

PhoG – a phosphatase functioning as a transcription factor in *Aspergillus fumigatus*?

Dr.rer.nat. Markus Schreitl
Sektion für Molekularbiologie

1 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.04.2011 – 31.03.2013

Zusammenfassung

Allgemeines:

Im Laufe dieses Projektes wurden 2 Hauptarbeiten durchgeführt. Eine Arbeit befindet sich derzeit „under revision“ zur Publikation in Applied and Environmental Microbiology.

In der zur Publikation eingereichten Arbeit wird eine neue Komponente des Siderophorsystems des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* beschrieben. Das Siderophorsystem ist ein sehr spezifisches hochaffines Eisenaufnahmesystem, welches für die Virulenz unentbehrlich ist und in Menschen nicht vorkommt. *A. fumigatus* scheidet die Siderophormoleküle TafC und FusarininC aus um Eisen aus der Umgebung zu binden. Diese Eisenbeladenen Moleküle werden vom Pilz aufgenommen und hydrolysiert. Das frei werdende Eisen wird zur Speicherung und für den weiteren Transport auf Siderophormoleküle im inneren des Pilzes übertragen.

Eine Reihe von Genen ist an der Produktion und am Abbau von Siderophormolekülen beteiligt. Diese liegen im Genom zum Teil in sogenannten Clustern vor. Im Zuge dieser Arbeit wurde eines dieser Gene, das sidJ Gen näher charakterisiert.

Eine Deletion des sidJ Gens führt zu vermindertem Wachstum unter Eisenmangelbedingungen und zu einer Erhöhung von intrazellulären Abbauprodukten des Siderophors Fusarinin C. Somit zeichnet sich SidJ für die hydrolytische Aktivität bei der Spaltung von FusarininC verantwortlich. SidJ stellt das erste auf funktioneller Ebene charakterisierte Mitglied der DUF 1749 (Domain of unknown function) Protein Familie dar. Eine Proteinfamilie die nur in Pflanzen und Pilzen zu finden ist.

Eine Infektion durch *A. fumigatus* bedeutet eine Anpassung des Pilzes an die geänderten Umweltbedingungen. Zu diesen geänderten Bedingungen gehören zB. eine erhöhte Außentemperatur von 37°C, Sauerstoffmangel, aber auch ein Mangel an Nährstoffen wie Eisen, Kohlenstoff oder Stickstoff. Ausgelöst durch C- oder N-Knappheit sezerniert *Aspergillus nidulans* (ein naher Verwandter von *A. fumigatus*) eine Vielzahl von extrazellulären Proteasen. Studien zeigten, dass das phoG Gen eine wichtige Rolle bei der Produktion dieser Proteasen spielt. Im Zuge dieser Arbeit wurde das phoG Gen in *A. fumigatus* charakterisiert.

Der untersuchte *A. fumigatus* Wiltyp besitzt zwei phoG Gene (phoG1 und phoG3) im Genom. Mittels Deletionsmutanten wurden die Rollen dieser Gene untersucht. Plättentests zeigen, dass beide Gene für das Wachstum und die Sporulation auf komplexen N- und C-Quellen nötig sind. Auch spielen beide Gene eine wichtige Rolle für die extrazelluläre proteolytische Aktivität. Weiters sind sie an der oxidativen Stressresistenz sowie an der Zellwand/Membranarchitektur der Zelle beteiligt.

Überraschungen:

SidJ stellt das erste funktionell charakterisierte Mitglied einer Proteinfamilie dar und die untersuchten phoG Gene haben an der Stressresistenz bzw. Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen einen weit größeren Einfluss als ursprünglich angenommen.

Publikationen mit MUI-Start Erwähnung

Gründlinger, Mario; Gsaller, Fabio; Schrettl, Markus; Lindner, Herbert; Haas, Hubertus (2013): *Aspergillus fumigatus SidJ mediates intracellular siderophore hydrolysis.* In: *Applied and environmental microbiology* 79 (23), S. 7534–7536. (IF 3,668)

Externe Förderung

Molecular characterization of ribosomal E-site function

Mag.biol. Nina Clementi PhD

Sektion für Genomik und RNomics

2 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 15.08.2011 – 14.08.2013

Zusammenfassung

During protein biosynthesis always two tRNAs are simultaneously bound to the ribosome, where they are transported from the A- (aminoacyl), to the P- (peptidyl) and finally to the E- (exit) binding site. Crystal structures showed the potential interaction between the universally conserved C2394 of the 23S rRNA with A76 of the E-tRNA, and stacking interactions between A76 and G2421 and A2422 of the 23S rRNA. Additionally U1851 and C1892 of the 23S rRNA are involved in a ribose-zipper interaction with position 71 of the E-tRNA. The aim of this study was the molecular and functional characterization of 23S rRNA residues which constitute the ribosomal E-site. To test the importance of tRNA - 23S rRNA contacts in the E-site an already established atomic mutagenesis approach was used, which allowed the introduction of non-natural nucleotides into the ribosome.

First ribosomes carrying modified nucleosides at positions U1851 and C2394 were reconstituted and tested in poly(Phe) synthesis and *in vitro* translation of a real mRNA. Neither a deoxy-nucleotide nor deletion of the entire base of U1851 had a drastic effect on both experiments, indicating U1851 not to be critical for the E-site during *in vitro* translation. Unexpectedly, ribosomes carrying either a ribose-abasic site at position 2394 within the 23S rRNA or a deoxy modification at the 2' position, were fully active in Poly(Phe) synthesis and *in vitro* translation, respectively. The only modification that led to inactive ribosomes in poly(Phe) synthesis and *in vitro* translation, respectively, was the entire removal of the ribose sugar (C3-linker). These data suggest that the ribose at C2394 is crucial for a productive E-site conformation in general, without directly interacting with the 2'-OH of A76.

To investigate the importance of base stacking interactions of A76 of the E-tRNA with G2421 and A2422 of the 23S rRNA, ribosomes lacking the base at these 23S rRNA positions were generated individually. Ribosomes lacking the base(s) at G2421 and A2422 were able to translate a poly(U) mRNA into poly(Phe) peptides as effective as the wild type ribosomes. However, when a natural mRNA was translated into full-length proteins, this pattern changed drastically. Deletion of the base at position 2421 of 23S rRNA completely inhibited *in vitro* translation. Both modifications - the single base deletion at 2421 and the double base deletion at 2421 and 2422 - led to inactivity in *in vitro* translation, indicating that only the interaction of A76 of the E-tRNA with G2421 and not with A2422 is crucial for translation. Moreover this interaction might be functionally more relevant than any interactions with C2394 of the 23S rRNA.

To gain a deeper insight into the functional importance of the guanine base at position 2421 of the 23S rRNA for a productive E-site during translation, these modified ribosomes were examined for their potential to induce different types of errors during *in vitro* translation. But ribosomes harboring an

abasic site at either 2421, 2422 or both, do not show an elevated misincorporation rate, and they are able to stay in frame when translating a poly(UUC) message.

Among bacteria and eukaryotes C2395 and G2421 of the 23S rRNA form a highly conserved base pair, which might be crucial for *in vitro* translation. To test the importance of this interaction, G2421 was mutated to C, thereby destroying the C-G base pair. These ribosomes were severely impaired in *in vitro* translation. However, reverting the base pair to C2395G-G2421C or introducing an U-A base pair at this position could successfully restore *in vitro* translation up to the wild type level. These data suggest that it is the presence of a base pair formed by positions 2395 and 2421, regardless of its composition, which is essential for *in vitro* translation. This finding is further strengthened by the existence of the antibiotic mycalamide A, which also binds in between this base pair and thereby inhibits translation by E-site blocking.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Koch, Miriam; Clementi, Nina; Rusca, Nicola; Vögele, Paul; Erlacher, Matthias; Polacek, Norbert (2015): The integrity of the G2421-C2395 base pair in the ribosomal E-site is crucial for protein synthesis. In: *RNA biology* 12 (1), S. 70–81. (IF 4,974)

Externe Förderung

Targeting IL-1b in composite tissue allotransplantation: Investigation of its local effect on skin rejection

Dr.med.univ. Theresa Hautz

Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie

2 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 20.10.2011 – 19.10.2013

Zusammenfassung

Background: Vascularized composite allotransplantation (VCA) serves as an excellent treatment option for reconstruction of severe tissue defects or congenital deformities. Skin rejection episodes with the need of lifelong immunosuppression limit the widespread introduction of this method. Cytokine expression profiles revealed that IL-1b was highly upregulated in biopsies of rejecting skin. We herein investigate the effect of an IL-1b blocker on skin rejection in a rat VCA model.

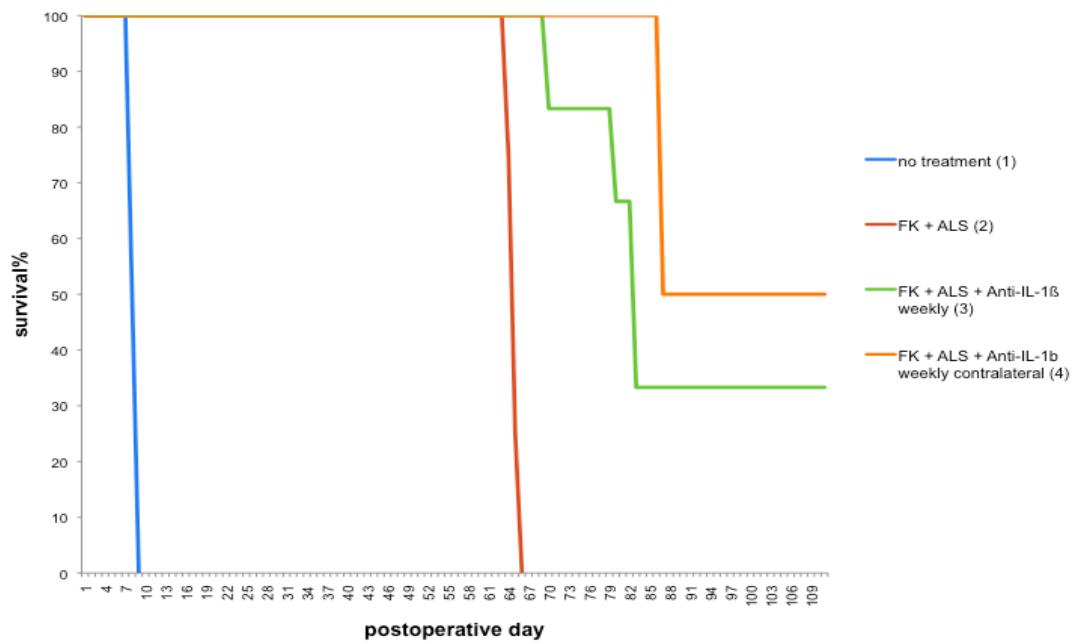
Methods: Anti-IL-1b was applied in an experimental rat hindlimb transplantation model (Brown Norway (BN) rats to Lewis (LEW) rats). Four different treatment groups included: No treatment (1); baseline immunosuppression consisting of FK506 30mg/kg for 50 days and ALS 0.5mL day 0 and 3 (2), baseline immunosuppression + weekly injections of Anti-IL-1b subcutaneously (s.c.) into the transplanted limb (3), baseline immunosuppression + Anti-IL-1b s.c. into the contralateral, non-transplanted limb (4). Endpoint was rejection grade III or postoperative day 100. Graft infiltrating T cells were isolated and assessed using flow cytometry analysis. Skin transplantations of BN and 3rd party rats were performed in long-survivors (>100 days) to assess for tolerance. Gene expression using RTqPCR was assessed for a set of cytokines involved in inflammation in donor skin.

Results: Weekly s.c. injections of Anti-IL-1b into the transplanted limb (group 3) resulted in significant prolongation of allograft survival (mean survival $85,3 \text{ days} \pm 11,2 \text{ days}$) as compared to the control group (2) ($64 \pm 0,7 \text{ days}$); $p < 0,05$. Two group 3 animals were completely free of rejection until day 100, which was confirmed by histology. Also, the underlying muscle was free of rejection in these animals. Weekly injections of IL-1 β into the non-transplanted, contralateral hindlimb (4) also prolonged allograft survival (mean survival $95,3 \pm 6,6 \text{ days}$) compared to group 2. Animals without any treatment (1) rejected on day $7,5 \pm 0,5$. BN and 3rd party skin grafts transplanted in long survivors after day 100 were rejected, suggesting that these animals were not tolerance. Graft infiltrating T cells in group 3 were composed of $61,4 \pm 1,0\%$ CD3CD4+ T cells and $37,9 \pm 1,0\%$ CD3CD8+ T cells. $18,0 \pm 2,0\%$ were identified as CD3CD4CD25+ T cells, of which $89,1 \pm 1,0\%$ were Foxp3+. No significant difference in graft infiltrating T cells was found between the groups. Relative gene expression of IL-1b, IL-1a and IL-6 was significantly decreased in skin of all different treatment groups, compared to untreated controls. Interestingly, gene expression of IL-2 and INF- γ was increased in the Anti-IL-1b treatment group (3).

Conclusions: IL-1b is a promising target for immunosuppression in extremity transplantation. Blocking IL-1b prolongs limb graft survival when given into the allograft or the contralateral limb in a rat VCA model.

Figures:

1. Graft survival: Anti-IL-1b injections significantly delayed ($n=4$) or prevented ($n=2$) skin rejection.



2. BN and 3rd party skin grafts transplanted in animals which survived until day 100 were both rejected.

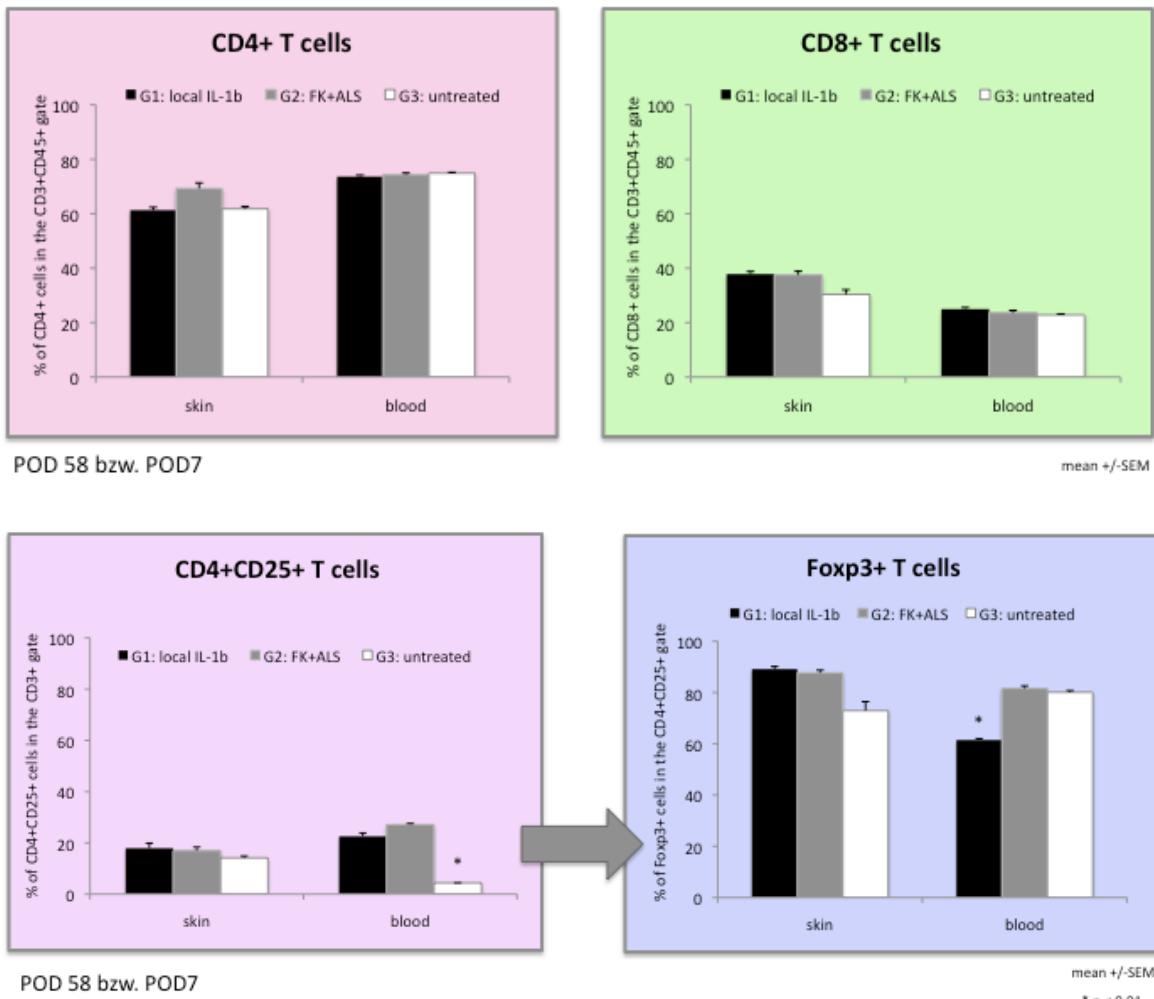


BN skin graft

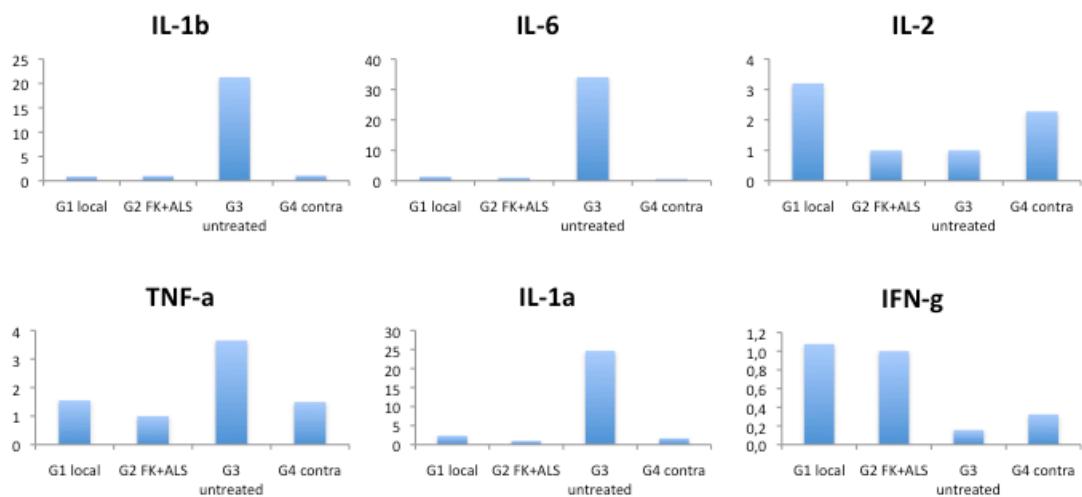


3rd party (SD) skin graft

3. Graft infiltrating T cells were composed of two thirds CD3CD4+ T cells and one third CD3CD8+ T cells with no difference between groups. A slight, but insignificant increase in CD3CD4CD25Foxp3+ Tcells was observed in the Anti-IL-1 β treatment group.



4. Relative gene expression of cytokines involved in inflammation was found to be completely different in treated (any treatment, groups 2-4) vs untreated animals (group 1).



Unexpected findings and surprises:

- An absolute surprise was that the contralateral administration of Anti-IL-1b also significantly prolonged allograft survival. However, this observation relies only on two animals transplanted

in this group (4). We have therefore transplanted three additional animals in this group, which currently receive the basic immunosuppression (ALS and daily tacrolimus) and will be finished in about 2 months.

- We would have expected a significant increase in graft infiltrating Foxp3+ T regulatory cells in the Anti-IL-1b group (3), compared to animals which were only treated with basic immunosuppression (group 2). Probably, the proportion of Foxp3+ Tregs during skin rejection is too small to see differences between these two groups. In hand transplanted patients Foxp3+ T cells were not always observed during rejection and if, they composed about 1-10% of the cell infiltrate.
- The gene expression data is hard to interpret at this stage of the project. After we will have finished the animals which we have transplanted additionally in the last weeks (n=1 in group 2, n=3 in group 3, n=3 in group 4), we will have a closer look at the Anti-IL-1b treatment group and will differentiate between the „full responders“ (graft survival until day 100, no rejection) and the „responders“ (grafts survival was prolonged, but graft was rejected before day 100, skin showed grade III rejection at sampling time-point).

In conclusion, we are more than happy to show for the first time that a cytokine blocker is able to prevent skin rejection in vascularized composite allotransplantation.

The results of this study are another important step towards targeted, specific immunosuppression/therapy in reconstructive transplantation.

Verfassen der Publikation wird im Sommer 2014 erfolgen; Eine Einreichung beim American Journal of Transplantation wird angestrebt. Vor kurzem wurden noch weitere Tiere operiert, um die animal numbers (n) der einzelnen Gruppen zu erhöhen. Auch die ELISA Experimente werden aus Prioritäts- und Kapazitätsgründen erst im Frühjahr 2014 erfolgen.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

Sonstiges

Die Arbeit wurde bereits auf 2 internationalen und 1 nationalen Kongress in Form eines Vortrages vorgestellt (Abstract veröffentlicht):

11th IHCTAS (International Hand and Composite Tissue Allotransplantation Society) Meeting, Wroclaw, Poland, August 29-31, 2013

16th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), Vienna, September 8-11, 2013

27th Meeting of the Austrian Society of Transplantation, Transfusion and Genetiks, Mayrhofen, October 23-25, 2013 (nominated for Young investigator award – experimental)

Effects of vasopressin on migration and oxygen free radical release of human leukocytes

Dr.med.univ. Martina Stichlberger
Univ.-Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin

2 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 15.09.2011 – 31.12.2013

Zusammenfassung

Dieses Projekt basiert auf Voruntersuchungen, die in der Originalarbeit *Wiedermann FJ, Kaneider N, Egger P, Tiefenthaler W, Wiedermann CJ, Lindner KH, Schobersberger W: Migration of human leukocytes in response to procalcitonin. Crit Care Med. 2002 May;30(5):1112-7* publiziert wurden. Wir führten ähnliche Versuche mit Vasopressin durch und untersuchten den Einfluss von Vasopressin auf die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie auf den „Oxydative Burst“ von neutrophilen Granulozyten.

Chemotaxis-Versuche: Humane Monozyten und neutrophile Granulozyten wurden aus EDTA-antikoaguliertem venösen Blut von gesunden Spendern mit deren schriftlichen Einverständniserklärungen nach vorheriger Aufklärung (Studiengenehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Universität Innsbruck, *Studienkennzahl UN4299, Sitzungsnummer: 298/4.26*) isoliert. Für den Migrationsassay wurden modifizierte 48-well mikrochemotaktische Kammern verwendet. Die Zellen wanderten durch einen Nitrozellulosefilter [5µm] mit einer Inkubation von 45 Min. (Monozyten) und 25 Min. (neutrophile Granulozyten) in einer humiden Atmosphäre (37°C und 5% CO₂) gegen einen

Gradienten der zu testenden Substanzen [formyl-Met-Leu-Phe (fmlp) und Vasopressin].

Anschließend wurden die Filter dehydriert, fixiert und mit HE gefärbt. Die Migrationstiefe im Filter wurde mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde die Distanz [µm] von der Oberfläche vom Filter zu der untersten Ebene der Zellen gemessen. Die Daten wurden als „chemotaktischer Index“ dargestellt, welcher das Verhältnis zwischen der Migration des Chemoattractants und der des Mediums ist. Vasopressin stimuliert in Abwesenheit von anderen „Chemoattractants“ die Monozyten- bzw. neutrophile Granulozyten-Migration je nach Konzentration in unterschiedlichem Ausmaß. Die stärksten Effekte wurden im micro- und nanomolaren (Monozyten) bzw. nanomolaren (neutrophile Granulozyten) Bereich erzielt. (siehe Abb. 1 und 2)

Präinkubationsversuch: Die Leukozyten wurden mit unterschiedlichen Vasopressin-Konzentrationen für 20 Minuten präinkubiert, zwei Mal mit phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und anschließend auf die Kammer aufgetragen. Es zeigte sich bei höheren Vasopressinkonzentrationen eine Hemmung der formyl-Met-Leu-Phe (fmlp) – induzierten Leukozyten-Chemotaxis (je höher die Vasopressinkonzentration war, umso stärker war die Hemmung). Im femtomolaren Bereich konnte bei den Monozyten eine Stimulation der formyl-Met-Leu-Phe (fmlp)-induzierten Chemotaxis festgestellt werden. (Abb. 3 und 4)

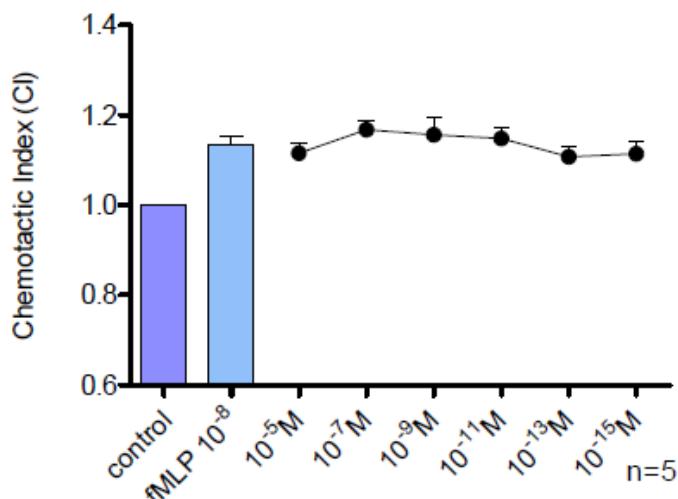
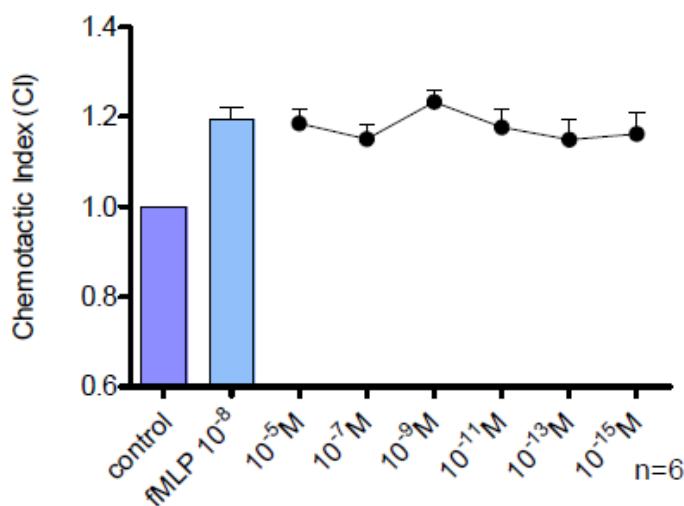
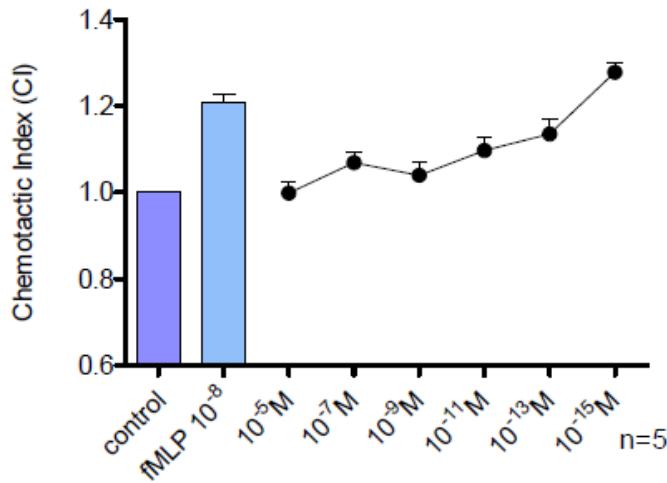
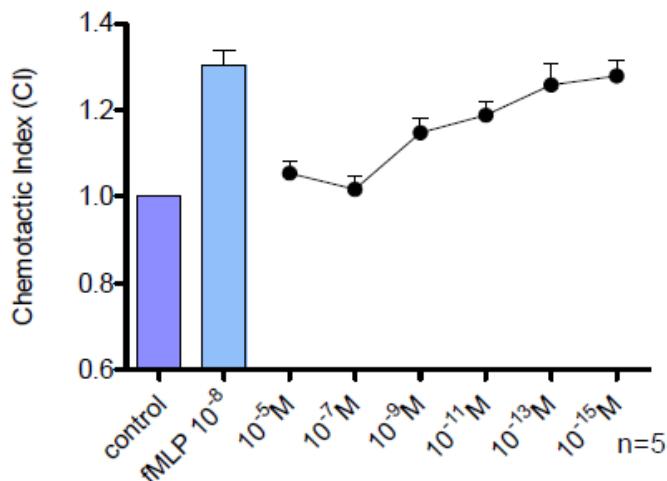
Abb. 1: Chemotaxis Monozyten bei unterschiedlichen Vasopressinkonzentrationen**Abb.2: Chemotaxis neutrophile Granulozyten bei unterschiedlichen Vasopressinkonzentrationen:**

Abb. 3: Präinkubation Monozyten



Monozyten wurden für 20 Minuten mit Vasopressin in unterschiedlichen Konzentrationen präinkubiert. Die anschließende Migrationsdauer im Nitrozellulosefilter Richtung formyl-Met-Leu-Phe (Konzentration: 10^{-8} mmol/l) betrug 45 Minuten. Vasopressin hemmt konzentrationsabhängig die formyl-Met-Leu-Phe (fmlp) induzierte Chemotaxis. Im femtomolaren Bereich zeigte sich eine Stimulation.

Abb. 4: Präinkubation Neutrophile Granulozyten



Neutrophile Granulozyten wurden für 20 Minuten mit Vasopressin in unterschiedlichen Konzentrationen präinkubiert. Die anschließende Migrationsdauer im Nitrozellulosefilter Richtung formyl-Met-Leu-Phe (Konzentration: 10^{-8} mmol/l) betrug 25 Minuten. Vasopressin hemmt konzentrationsabhängig die formyl-Met-Leu-Phe (fmlp) induzierte Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten.

Checkerboardanalyse: Chemotaxis oder Chemokinese?

In der nachfolgenden Checkerboardanalyse konnte nicht festgestellt werden, ob es sich bei der Vasopressin-induzierten Migration um Chemotaxis oder Chemokinese handelt.

(Tab.1+2)

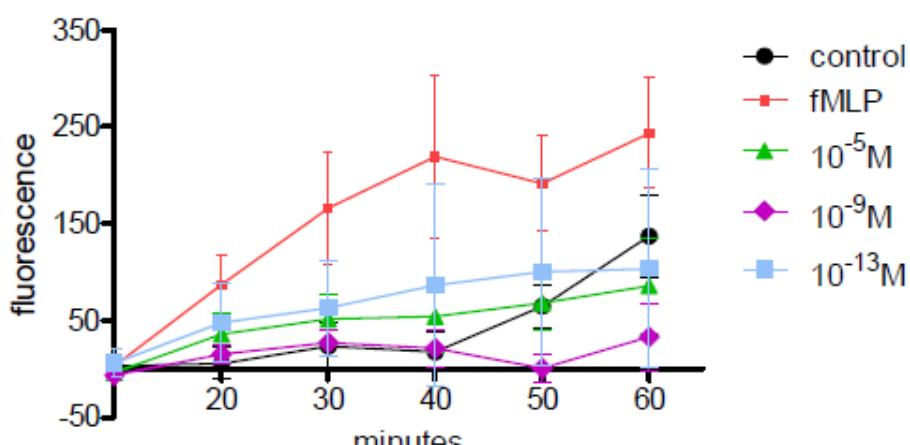
Tab. 1: Checkerboard-Analyse neutrophile Granulozyten (n=6)

	Medium	10^{-7}	10^{-9}	10^{-11}
Medium	1,000±0,000	1,160±0,052	1,170±0,112	1,025±0,074
10^{-7}	1,115±0,106	1,072±0,096	1,124±0,096	0,981±0,080
10^{-9}	1,137±0,066	1,064±0,097	1,094±0,093	1,077±0,074
10^{-11}	1,160±0,103	1,121±0,092	1,081±0,087	1,024±0,117

Tab. 2: Checkerboard-Analyse Monozyten: n=4

	Medium	10^{-7}	10^{-9}	10^{-11}
Medium	1,000±0,000	0,953±0,157	1,098±0,051	1,154±0,134
10^{-7}	1,105±0,058	0,935±0,128	1,022±0,099	1,088±0,081
10^{-9}	0,982±0,117	0,935±0,166	1,073±0,112	0,978±0,089
10^{-11}	1,015±0,086	1,012±0,144	1,049±0,055	1,046±0,095

Oxydative Burst Experimente: Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei neutrophilen Granulozyten wurde mittels nicht-floureszierendem Dichlorfluorescin-Diacetat (DCFH-DA) das zum hochfloureszenten 2,7 Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert, bestimmt. Es zeigte sich, dass Vasopressin den Respiratory burst der neutrophilen Granulozyten nicht oder nur geringgradig – im Gegensatz zu formyl-Met-Leu-Phe (fmlp) – fördert. (siehe Abb. 5)



Zusammenfassung

Wir konnten mit unseren Versuchen zeigen, dass VP Einfluss auf die Leukozytenmigration hat. Vasopressin wird bei Patienten im schweren Schockgeschehen aufgrund seiner Wirkungen auf das Gefäßsystem eingesetzt. In Zukunft sollte auch Augenmerk auf die immunmodulierenden Eigenschaften von Vasopressin gelegt werden. Procalcitonin ist besonders bei den kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen ein wichtiger Entzündungsmarker. Vielleicht könnte uns die Bestimmung der Serumkonzentrationen von Vasopressin bei kritisch Kranken ähnliche Hinweise liefern. Diese Überlegungen sowie die Entwicklung eines Procalcitonin- bzw. Vasopressin-Agonisten/Antagonisten werden Kernpunkt unserer nächsten Untersuchungen sein.

Ich war bisher nur klinisch tätig. Im Rahmen dieses Projektes konnte ich Einblick in die oft schwierige „Labortätigkeit“ gewinnen und wie frustrierend es sein kann, wenn Versuche mehrmals nicht funktionieren. Besonders interessant war die interdisziplinäre Zusammenarbeit mit dem Department für Innere Medizin. Aufgrund diverser logistischer und personeller Probleme hat sich der Projektstart mehrmals verzögert. Dank Mag. Kathrin Watzinger, die mich mit sehr viel Engagement bei den Versuchen unterstützt hat und mich in die diversen Techniken eingeführt hat, konnte diese Versuchsreihe letztendlich erfolgreich abgeschlossen werden. Besonderer Dank gilt ferner Prof. Franz Wiedermann, von dem die Idee zu dieser Forschungsarbeit stammt, und der mir während der gesamten Projektdauer mit Rat und Tat zur Seite stand. Weitere gemeinsame Projekte (zum Beispiel: „Development of an agonist and antagonist of procalcitonin in a bioassay – migration of human monocytes in response to procalcitonin and its fragments“) sind bereits in Planung.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen anderen an dieser Studie beteiligten Personen für ihre Unterstützung herzlich bedanken, vor allem aber bei der MUI-START-KOMISSION, die mir durch die Gewährung des „MUI-START-Stipendiums“ überhaupt erst die Durchführung dieses Forschungsprojektes ermöglicht hat.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

Die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase im Bezug auf den Ischämie Reperfusions schaden sowie auf die chronische Transplantat Dysfunktion

Dr.med.univ. Rupert Oberhuber
Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie

2 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 22.07.2011 – 21.07.2013

Zusammenfassung

In vielerlei Hinsicht hat sich die moderne Transplantation Medizin von einem experimentellen Therapieansatz für einige wenige, zu einer anerkannten Therapieoption für eine Vielzahl von Patienten welche an einem terminalen Organversagen leiden, entwickelt. Trotz großer Fortschritte im Bereich der Immunosuppression, der Infektionsprophylaxe, oder der Organ-preservation, gilt die chronische Abstoßung noch immer als ungelöstes Problem. Während die Rate von akuten Abstoßungen in den letzten Jahren immer weiter reduziert werden konnte, blieben die Raten von chronischen Abstoßungen, bzw. später Organverluste nahezu unverändert.

Ein wesentlicher Risikofaktor, für die Entwicklung einer chronischen Abstoßung stellt der Ischämie Reperfusions schaden, dabei gilt: je länger das Organ ischämisch ist (Zeitraum zwischen Organentnahme und Organimplantation), umso höher die Wahrscheinlichkeit, dass das Organ einen Ischämie Reperfusion Schaden erleidet. Der Ischämie Reperfusions schaden scheint dabei das adaptiven Immunsystems zu aktivieren. Es kommt zu einer stetig schwelenden Entzündung welche schlussendlich in einer chronischen Abstoßung endet.

Das geförderte Projekt baut auf Erkenntnisse, die im Daniel Swarovski Labor (Department für Visceral-, Transplantation- und Thoraxchirurgie, Medizinische Universität Innsbruck, Leiter: Univ. Prof. Dr. Johann Pratschke) gewonnen wurden. Wir konnten an einem Mausmodell zeigen, dass die Verabreichung des Stickstoffmonoxid Synthase (NOS) Ko-faktors Tetrahydrobiopterin den Ischämie Reperfusion Schaden nach experimenteller Pankreastransplantation deutlich verringert (1-3).

Weiters konnten wir zeigen, dass (a) die Therapie des Spenders mit Tetrahydrobiopterin (im Unterschied zur Therapie des Empfängers oder zur isolierten Spülung des Organs mit Tetrahydrobiopterin) die beste Strategie darstellte und dass (b) die beobachtet protektive Wirkung Tetrahydrobiopterin-spezifisch ist (2,3). Der Vergleich mit Tetrahydrobiopterin-Analoga, die bis auf die Ko-faktor Funktion für NOS dem Tetrahydrobiopterin ebenwertig sind, legte den Schluss nahe, dass für die protektive Wirkung die Funktion als essentieller Ko-faktor der NOS ausschlaggebend sein muss. Ein wesentliches Merkmal unterschiedlicher kardiovaskulären Pathologien ist die Entkopplung der endothelialen Isoform der NOS und der damit verbundenen vermehrten Sauerstoffradikalbildung. Dies steht in engem Zusammenhang mit einem Mangel an Tetrahydrobiopterin in den Endothelzellen (4).

Wir stellten nun die Hypothese auf, dass es, ähnlich zu den kardiovaskulären Erkrankungen, im Rahmen des Ischämie Reperfusion Schadens am transplantierten Organ zu einem Mangel an Tetrahydrobiopterin kommt, und somit die endothiale NOS entkoppelt wird. Die Verabreichung von Tetrahydrobiopterin vor Organentnahme soll diese Entkopplung verhindern und dadurch das Organ vor den Ischämie Reperfusion Schaden und letztlich vor einer chorischen Abstoßung schützen.

Hierzu war es zuerst nötig ein Aortentransplantationmodell, welches ein ideales Modell zur Untersuchung der Chronischen Abstoßung darstellt zu etablieren.

Abschlussberichte

Der Ischämie Reperfusion Schaden wurde durch eine 24-stündige Ischämiezeit induziert. Als Spendertier wurden BALB/c Mäuse, als Empfänger C57Bl6 verwendet. Dies ermöglicht es eine Intimahyperplasie als Surrogat-Parameter der chronischen Abstoßung zu bestimmen, wobei es in diesem Modell nicht nötig ist eine immunosuppressive Therapie zu verabreichen.

Entsprechend unseren preliminären Daten welche im Pankreastransplantation-Model generiert wurden, wurden nur die Spendertiere mit Tetrahydrobiopterin therapiert. Zwei unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte wurden gewählt, an denen das Transplantat, nach erfolgter Implantation untersucht wurde: (1) 10 Minuten und (2) 4 Wochen nach Reperfusion.

Jeder Untersuchungszeitpunkt beinhaltete 4 Gruppen: (1) nicht therapierte Spendermäuse wobei hier 24h kalte Ischämiezeit verwendet wurde, (2) mit Tetrahydrobiopterin therapierte Spendermäuse wobei 24h kalte Ischämiezeit verwendet wurde, (3) nicht therapierte, Spendermäuse wobei keine kalte Ischämiezeit verwendet wurde, (4) als Kontrolle wurde eine syngene Gruppe verwendet (C57Bl6 als Spender und Empfänger).

Nach den jeweiligen Reperfusionszeitpunkten wurden die Gewebe zur weiteren Aufarbeitung entnommen. Dabei wurde eine histopathologische Befundung, um den Grad des Parenchymenschadens bzw. das Ausmaß der Intimahyperplasie zu bestimmen. Hierzu wurden repräsentative Aortenschnitte mit H&E gefärbt. Um das Ausmaß der Intimahyperplasie genauer bestimmen zu können wurde zusätzlich Elastika-van-Gieson Färbung, sowie eine Immunohistochemie gegen alpha-SMA durchgeführt. Des weiteren wurde die Endothelzellaktivierung mittels eines immunohistochemischen Nachweises gegen P-Selektin quantifiziert. Um den endothelial Ursprung der P-Selektin Expression zeigen zu können wurde des Weiteren eine Doppelimmuno- Fluoreszenz gegen VWF als Endothel Zell Marker sowie, P-Selektine durchgeführt. Tetrahydrobiopterinspiegel im Gewebe der transplantierten Organe wurde mittels HPLC bestimmt. Weiters wurde das Ausmaß der ROS Bildung unter Zuhilfenahme eines Glutathion-assays bestimmt.

Im ersten Teil des Forschungsvorhabens konnten wir den protektiven Effekt einer Therapie mit Tetrahydrobiopterin im Rahmen des Ischämie Reperfusionsschadens in dem von uns verwendeten Aortentransplantationsmodell reproduzieren. Eine Verlängerung der kalten Ischämiezeit auf 24h führte zu einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses von reduziertem GSH zu seiner oxidierten Form GSSG, im Vergleich zu Transplantaten ohne kalte Ischämiezeit. Eine Spendervorbehandlung mit BH4, hingegen führte zu einer Erhöhung des Verhältnisses von GSH zu GSSG, was einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Gruppe darstellt. Zwischen der Therapiegruppe und der Kontrollgruppe ohne kalte Ischämiezeit ließ sich kein Unterschied nachweisen.

Die histopathologische Auswertung der transplantierten Aorten nach einer Reperfusionszeit von vier Wochen zeigte, dass es in dem von uns verwendeten Versuchsaufbau, abhängig von der kalten Ischämiezeit bzw. des Spenderstammes, zu einer konzentrischen Intimahyperplasie kommt. Wurden die Aorten mit einer kalten Ischämiezeit von 24h transplantiert, war diese Hyperplasie am stärksten ausgeprägt. Im Vergleich dazu kam es in der allogenen Gruppe zu einer signifikant verminderen Hyperplasie der Intima. Auch in der syngenen Kontrollgruppe mit 24h kalter Ischämiezeit zeigte sich nach 4 Wochen kaum eine Intimahyperplasie. Eine Behandlung mit BH4 hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der Intimahyperplasie. Im Vergleich mit der syngenen Kontrollgruppe ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Intimahyperplasie.

Erwartungsgemäß zeigte sich 10h nach Reperfusion, unabhängig von der Dauer der kalten Ischämiezeit bzw. von der Therapie, keinerlei Intimahyperplasie. Der immunohistochemische Nachweis von alpha-SMA bestätigte, dass es sich bei der in diesem Modell beobachteten Intimahyperplasie um eine für die chronische Abstoßung spezifische Veränderung handelt und nicht um eine andere Form der

Arteriosklerose. Der immunohistochemische Nachweis von P-Selektin ergab eine deutliche Endothelzellaktivierung 4 Wochen nach Transplantation. Mittels Immunofluoreszenz konnten wir weiters zeigen, dass die vermehrte Expression von P-Selektin Endothelialen Ursprungs ist.

Die Schlussfolgerungen daraus: (1) die protektive Wirkung von Tetrahydrobiopterin im Rahmen des Ischämie Reperfusionsschadens lässt sich auch in einem allogenen Modell reproduzieren.

(2) eine Verringerung des Initialen Ischämie Reperfusionsschadens für zu einer deutlichen Verringerung bzw. Verlangsamung einer chronischen Abstoßung in dem von uns verwendeten Modell.

Referenzenliste

- (1) Maglione M, Hermann M, Hengster P, Schneeberger S, Mark W, Obrist P et al. Tetrahydrobiopterin attenuates microvascular reperfusion injury following murine pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2006;6(7):1551-1559.
- (2) Maglione M, Oberhuber R, Cardini B, Watschinger K, Hermann M, Obrist P et al. Donor pretreatment with tetrahydrobiopterin saves pancreatic isografts from ischemia reperfusion injury in a mouse model. *Am J Transplant* 2010;10(10):2231-2240.
- (3) Maglione M, Cardini B, Oberhuber R, Watschinger K, Jenny M, Gostner J et al. Prevention of lethal murine pancreas ischemia reperfusion injury is specific for tetrahydrobiopterin. *Transpl Int* 2012.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Oberhuber, R.; Ritschl, P.; Fabritius, C.; Nguyen, A-V; Hermann, M.; Obrist, P. et al. (2015): Treatment With Tetrahydrobiopterin Overcomes Brain Death-Associated Injury in a Murine Model of Pancreas Transplantation. In: *American journal of transplantation* Jun 23. (IF 5,683)

Oberhuber, Rupert; Mittermair, Christof; Zelger, Bettina; Pirkebner, Daniela; Draxl, Anna; Weissenbacher, Annemarie et al. (2013): Rotational transport of islets: the best way for islets to get around? In: *BioMed research international* 2013, S. 975608. (IF 1,579)

Oberhuber, Rupert; Cardini, Benno; Kofler, Markus; Ritschl, Paul; Oellinger, Robert; Aigner, Felix et al. (2014): Murine cervical heart transplantation model using a modified cuff technique. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (92), S. e50753. (IF 1,325)

Externe Förderung

Aufbauend auf die Daten welche im Rahmen des bewilligten Projektes generiert wurden, wurde ein Antrag zur Förderung durch den Tiroler Wissenschaftsfonds 2013 bewilligt.

Titel des Antrages:

Tetrahydrobiopterin as novel therapeutic strategy to improve outcome after the transplantation of organs from brain death donors.

Sonstiges

Des weiteren wurden die Daten auf mehreren nationalen sowie internationalen Kongressen präsentiert; in dem Rahmen eine Publikation der Abstracts erfolgte.

Unter anderem:

- Kongress der Europäischen Gesellschaft für Transplantationschirurgie 2011 in Glasgow
- Kongress der Amerikanischen Gesellschaft für Transplantationschirurgie 2011 in Philadelphia

Abschlussberichte

- Basic-Science-Meeting der Amerikanischen und Europäischen Gesellschaft für Transplantationschirurgie in Boston 2011.
- Österreichischer Chirurgenkongress 2011 und 2012
- Deutscher Chirurgenkongress 2011 und 2012
- Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Transplantation, Transfusion und Genetik 2011 und 2012.

- Projektabschlussberichte der 3. Antragsperiode

Role of the prosurvival BCI-2 family protein A1 in T cell homeostasis and autoimmune disease

Mag. Selma Tuzlak

Sektion für Entwicklungsimmunologie

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2012 – 31.12.2013

Zusammenfassung

In this study the role of the prosurvival Bcl-2 family member A1 in T cell development, T cell distribution and function was investigated.

First, the expression pattern of A1 mRNA was analyzed in several T cell subsets by cell sorting and performing a semi-quantitative real-time PCR (qRT-PCR). In the thymus we found highest A1 mRNA levels in SP4 and DN stage cells. Interestingly, in the literature controversial observations concerning A1 expression in the thymus were made. Tomayko *et al.* observed highest A1 expression levels in DP thymocytes followed by SP4 cells by performing semi-quantitative RT-PCR¹. Mandal *et al.* could also observe a relative increase in A1 mRNA from DN3 to DN4 to DP stage thymocytes but did not analyze SP populations². They also performed a semi-quantitative RT-PCR and calculated the increase by comparing the value of A1 with the value of β-actin. Verschelde *et al.* observed the highest expression in SP4 thymocytes, being up to 30 times higher than A1 expression in DN3, DN4, DP and SP8 thymocytes³. They performed qRT-PCR and compared the values of A1 to HPRT using the Pfaffl method⁴.

Obviously, all analysis was performed using different experimental methods and different quantification approaches. This can explain the different results. For reasons of better comparability of qRT-PCR data a standardization of the process should be considered.

Of course the mRNA level cannot be completely conferred to protein levels, as the mRNA can undergo several modifications or even degradation before being translated. Yet, until recently no antibody was available that can detect murine A1 at endogenous amounts.

A1 was considered to be an early response gene⁵⁻⁶. We could confirm this observation by performing qRT-PCR on activated CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes. A1 was highly induced in CD4⁺ and CD8⁺ T cells already 2 to 4 h upon TCR activation with α-CD3 and α-CD28, indicating its role as early response gene upon TCR-engagement. Therefore, it is likely that A1 acts as first survival factor for activated T cells until more stable and longer living pro-survival Bcl-2 proteins are upregulated. On the other side, A1 protein has an extremely short half-life of only 30 minutes⁷ which is in accordance with the idea that A1 is quickly upregulated as first response after TCR engagement but also rapidly degraded when other pro-survival members of the Bcl-2 family are induced gradually. Whereas the nearest relative to A1, Mcl-1, has also a short half-life of approximately 30 minutes to 3 hours⁸⁻⁹, Bcl-2 and Bcl-xL are stable and long-living proteins⁸. Concordantly, we observed that TCR-activation led to an upregulation of Bcl-xL mRNA only after 8 to 24 h after stimulation in CD4⁺ T cells and to a slight but constant upregulation after 4 h in CD8⁺ T cells. However, Bcl-2 and Mcl-1 remained largely unaffected by TCR engagement and may be upregulated via different stimuli or are regulated mainly at the protein level.

Abschlussberichte

A1 was also induced in memory T cells when compared to naïve T cells, further pointing to a role of A1 in activated cells. An upregulation of A1, Bcl-xL and Bcl-2 was described earlier for CD8⁺ memory T cells¹⁰⁻¹². In this context we observed a clear increase of Bcl-xL mRNA especially in CD8⁺ memory cells. However, we could not confirm the previous observations of elevated Bcl-2 mRNA levels in CD8⁺ memory cells¹¹. Further we analyzed the A1 expression in several T effector subsets that were differentiated *in vitro*. There were no differences in A1 expression within differentiated T helper cells *in vitro*, but there was a striking decrease of A1 mRNA in iTregs compared to Th0 cells, perhaps due to a lower TCR signaling on iTregs *in vivo*¹³.

Our data strongly support the hypothesis that A1 is a key player in T cells upon TCR-mediated activation, especially since other anti-apoptotic Bcl-2 family member are only later upregulated and to a less extent as A1. Still, to date these indications could not be verified in a physiological context as generation of A1 deficient mice is not easily feasible due to quadruplication of the A1 locus in the mouse genome. To be able to investigate the impact of A1 deficiency on T cell development, differentiation and function *in vivo* we used two mouse models, expressing either constitutively or reversibly mi-shRNAs targeting all functional A1 isoforms in the hematopoietic system¹⁴.

The constitutively expressed mi-shA1 is under the control of the hematopoietic *Vav* promotor. Simultaneously, the fluorescent protein *venus* is expressed to visualize the efficiency of the shRNA-expression. This mouse model is termed *VVA1.2* (**Fig. 1**). A control-strain (*vav-venus-miR30-Firefly*) is expressing a mi-shRNA against firefly-luciferase under control of the same promoter. This mouse-model is referred as *VVFF*.

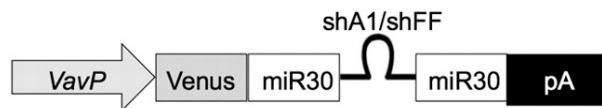


Fig. 1 Schematic depiction of the plasmid used for generation of VVA1.2 mice.

Reversible A1 knock-down was achieved by using tetracycline responsive promoters⁷¹. Therefore two mouse systems are required. One mouse strain harbors the shRNA against A1 (shA1) under the control of a tetracycline-responsive element (TRE) associated with a CMV^{min} promoter and is located upstream of an eGFP-marker that is driven by the human ubiquitin promoter (UbiP) (*TRE-miR30-shA1-ubiP-eGFP-WPRE*, **Fig.2**). This mouse model will be referred to as *Wolo*. The second mouse model (*vav-tTA*⁷²) is expressing a tetracycline transactivator (tTA), again driven by the *Vav*-gene promoter⁷³ and is termed *vavtTA*. Mating these two mouse strains results in double-transgenic mice expressing the tTA that binds to the TRE and therefore induces conditional shA1 expression that can be visualized by enhanced eGFP expression (*vav-tTA-TRE-miR30-shA1-ubiP-eGFP-WPRE*). This strain will be referred as double-transgenic (*DT*).



Fig. 2 Construct harboring an inducible shRNA against A1.

The development of thymocytes is in general highly dependent on the presence of Bcl-2 protein family members. The absence of Mcl-1 for example leads to an developmental stop in the transition from DN2 to DN3¹⁵ while Bcl-xL is upregulated during DP stage prior to positive or negative selection¹⁶,

respectively. Also, Bcl-2 is an important survival factor and antagonist of Bim during positive or negative selection¹⁷. A1 has been shown to be upregulated upon pre-TCR rearrangement between DN3 and DN4² and is thought to be crucial for T cell survival during β-selection as it is the only enhanced pro-survival Bcl-2 family member at this stage. According to this a delay of the transition from DN3 to DN4 was observed in *DT* and *VVA1.2* mice by our group in former studies¹⁴. Further, DP thymocytes were decreased accompanied by increased amounts of DN and SP8 T cells in the *DT* thymus. In our studies, we could confirm the accumulation of DN3 stage coming along with a reduction of DN4 stage cells in *DT* thymocytes compared to transgenic controls, which is supporting the former observations. However we could not see any differences in the distribution of DP, SP and DN stages between *DT* and control thymocytes contrasting earlier studies in our lab performed on mixed genetic background (B6xFVB F1). Further, no accumulation at the DN3 stage was observed in *VVA1.2* mice, as noted before suggesting insufficient knock-down in this model.

A possible impact of A1 on T cell development was analyzed in more detail by using the OP9-DL1 differentiation system. Therefore, DN1 thymocytes were isolated and observed for developmental progress *in vitro*. All genotypes successfully reached the SP stages and no significant difference was observed between A1-KD cells and controls after 7 days in culture. Interestingly, *VVA1.2* cells tended to accumulate in DN1 stage and had significantly less DN2 stage cells after 4 d in culture. This could be a consequence of A1 deficiency that is just too weakly pronounced to be seen *in vivo*. Since there is no reported A1 expression before the stage of β-selection, this phenotype remains to be clarified. When *in vitro* culture was started from DN3 stage, no genotype showed impaired T cell development and reached the SP stage regardless of the presence of A1. It must be considered that the A1-KD might not be efficient enough and low A1 expression could be sufficient to provide successful T cell development. However, further analysis should be performed to completely resolve the role of A1 in β-selection.

There are also reports that A1 plays a role in positive selection as A1-tg mice showed and accumulation of thymocytes awaiting positive selection³. TCR-transgenic mice expressing the male antigen HY are often used to investigate positive or negative selection, respectively. For instance it has been shown that overexpression of Bcl-2 led to survival of thymocytes that are not positively selected¹⁸ and overexpression of A1 allowed progression of T cells to the DP stage in *Rag*^{-/-} mice³. To further investigate the role of A1 in positive selection, we analyzed HY/*DT*-tg and HY/*VVA1.2*-tg female mice, respectively. Indeed, HY/*DT* mice had a highly disturbed positive selection as suggested by an accumulation of DP and a decrease in SP thymocytes. The increase in DP thymocytes may be caused by the expression of other anti-apoptotic proteins like Bcl-xL during this stage¹⁶. Alternatively, impaired positive selection signals to increase expansion of the DP pool, in order to satisfy the demand. A1 may participate in the survival of positively selected thymocytes after TCR-mediated binding to the MHC. Yet, no impaired positive selection was observed in HY/*VVA1.2* mice, but it has to be considered that these mice have always shown a weaker phenotype.

Thus, we could show that *DT* thymocytes displayed a delayed transition from DN3 to DN4 stage and also impaired positive selection. However, conclusions from this data should be drawn very carefully as no differences in the distribution of DN, DP and SP thymocytes and in the cellularity of the thymus were observed. Furthermore, the *VVA1.2* mice did not show any impaired T cell development or distribution in line with previous results on mixed genetic background (DBAxB6). Therefore further analysis needs to be performed to resolve the functions of A1 in the thymus.

We also investigated the distribution of several other cell types in the periphery of the naïve mice. No differences were found in the distribution of γδ-T cells or dendritic cells in *VVA1.2* mice. However, in *DT*

Abschlussberichte

mice dendritic cells were significantly decreased in the spleen and increased in the bone marrow. The increased percentage of dendritic cells in the bone marrow is likely due to the relative decrease of granulocytes¹⁴. Further, we observed a profound increase of CD4⁺ T cells within the *DT* population of splenocytes, making up to 50% of splenocytes. It is not clear yet whether this relative increase of CD4⁺ T cells is due to increased proliferation, impaired cell death after activation or a loss of B cells. Since the mice did not display any autoimmune diseases also the functionality of these cells remains elusive. Furthermore, no relative decrease in *DT* CD8⁺ T cells was observed. As cellularity of the spleen was not altered in *DT* mice compared to the controls, the increase of CD4⁺ *DT* T cells might be compensated by decreased numbers of *DT* dendritic cells and *DT* γδ-T cells.

DT splenocytes showed a significant increase in CD4⁺ naïve T cells accompanied by a decreased amount of effector memory cells, pointing to a possible role of A1 in the survival of CD4⁺ effector memory cells. This would be in accord with the higher A1-mRNA expression we observed in WT memory T cells compared to naïve T cells.

We also saw decreased amounts of Tregs in *DT*, but not in *VVA1.2* populations of the spleen. This can be explained by former observations where an enhanced expression of A1 and Noxa was observed in Tregs compared to Tcons²⁰. This elevation of A1 may occur due to strong TCR mediated stimuli that rapidly require pro-survival factors to antagonize the elevated BH3-only protein Noxa. Therefore, the absence of A1 may lead to augmented apoptosis in Tregs caused by increased levels of Noxa, a hypothesis that still needs to be confirmed experimentally. *DT* Tregs in the spleen displayed a normal expression of the Treg specific markers FoxP3 and CD25, but showed a tendency to lower expression of GITR and CTLA4, two important regulators of Treg function²¹⁻²², suggesting that they may not be fully functional. Although, we saw no aberrant amounts of Tregs in *DT* thymocytes, there was a clear tendency to reduced expression of GITR, indicating a diminished Treg cell function already in the thymus. Reduced numbers of Tregs are known to participate in human autoimmune diseases like immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX)²³ and are also linked to Multiple Sclerosis (MS)²⁴ and it will be interesting to test functionality of these Tregs in adequate model systems. The efficiency of induced Th cells to produce adequate cytokines was examined in T cells derived from the *DT* as well as in T cells from *vavtTA* and *Wolo* mice *in vitro*. *DT* iTTh1 cells were slightly reduced compared to single transgenic controls but apart from this no significant differences in induction efficiency were observed between *DT*, *vavtTA* and *Wolo* iTTh cells, indicating a normal phenotype in A1-KD Th cells, at least *in vitro*. Notably, A1 deficient CD4⁺ T cells could be efficiently differentiated towards iTTregs, being consistent with the low abundance of A1-mRNA in iTTregs. Thus, the role of A1 deficient iTTregs has to be examined *in vivo* by using models e.g. of oral tolerance and analyzing iTTregs with specific markers like Helios and Neuropilin 1²⁵.

In summary, it can be said that the reversible knockdown model is supporting the idea of A1 being important for the proper transition of DN3 to DN4 cell stage of thymocyte development, and for the survival of activated T cells, in particular memory T cells in the periphery. However, it has to be mentioned that experimental evidence suggests a possible cytotoxicity of the tTA protein, possibly being responsible for some of the observed phenotypes.

The constitutive mouse model, *VVA1.2*, did not display any aberrations in T cells populations compared to controls, possibly due to lower A1-KD efficiency as in *DT* mice¹⁴. However, without further investigations it remains difficult to attribute the phenotype of the *DT* mice to A1-deficiency.

As A1 has been shown to be an early response gene upon TCR-activation⁵ and has also been reported to play a role in inflammatory events²⁶⁻²⁷ we wanted to investigate the effects of an inflammatory

challenge in an environment with reduced A1 expression. Therefore, we used colitis and EAE, two mouse models of autoimmune diseases. Former studies have already shown a connection between aberrant function of Bcl-2 family members and autoimmune diseases²⁸. SLE patients often show overexpression of Bcl-2²⁹, Mcl-1³⁰ or A1³¹, respectively, supporting the correlation of deregulated apoptosis and exaggerated inflammation.

Colitis was induced in *RAG-1*^{-/-} mice that lack T and B cells due to ineffective rearrangement of pre-TCR/BCR, but have otherwise a fully functional innate immune system. Therefore, it is an ideal model to study T cell intrinsic functions. We injected purified Tcons from *DT* or *vavTA* splenocytes, respectively and monitored the course of disease. Surprisingly, no differences between the genotypes were observed during the course of disease and also when examining spleen and lymph nodes of the sacrificed mice. Noteworthy, we found a decreased number of *DT* iTregs when compared to mice injected with T cells from *vavTA* mice, a finding that awaits confirmation. Thus, A1-deficiency in T cells is insufficient to alter the progress of disease in an acute model of colitis, suggesting possible redundancy with other Bcl-2 prosurvival molecules such as Mcl-1.

In EAE, T cells are primed to be specific for CNS antigens and after they pass the blood-brain-barrier they cause clinical symptoms similar to MS in humans. It has already been shown that Bcl-2 family members impact the onset and progress of EAE, as the overexpression of Bcl-xL led to an earlier onset of the disease³² and Bim-deficiency caused reduced response to EAE induction³³. The latter is interesting in so far as Bim has been shown to participate in T cell activation via the calcium/NF-AT pathway³³ being crucial for the expression of IL-2 and therefore for T cell activation which leads to A1 upregulation^{5, 34-35}. Furthermore, a more severe chronic phase of the disease was observed in Bcl-2 overexpressing mice, but no difference in the onset of EAE compared to WT³⁶. Interestingly, *A1-a-tg* T cells are reported to exhibit a higher viability rate upon stimulation with Con A than *Bcl-2-tg* T cells⁶, reinforcing the importance of A1 for activated T cells. Therefore, EAE was induced in *VVA1.2* and *MirFF* mice and monitored them daily for clinical symptoms. *VVA1.2* mice displayed a delayed onset of EAE compared to *MirFF* mice. This data show that albeit A1-deficiency in T cells alone is not sufficient to alter the progression of colitis, the knockdown of A1 throughout the immune system can significantly delay the onset of EAE, whether this phenomenon is due to impaired T cell function remains to be established as this may also be due to altered function of antigen presenting cells like DC or impaired functionality of macrophages or B cells that secrete myelin specific autoantibodies. In this context a pronounced increase of monocytes and macrophages was earlier reported in A1-KD mice and A1-KD cells from the bone marrow rather differentiated into macrophages than into granulocytes¹⁴. But the functionality of these macrophages has not been tested yet. Nevertheless, it has to be mentioned that the EAE experiment has to be repeated to strengthen the current results and wild-type controls have to be included.

In conclusion, we demonstrated that A1 is highly upregulated in T cells after TCR stimulation and activated T cell subsets like memory T cells. The reversible A1-KD model supports the idea of A1 being important for β-selection as well as positive selection, although we could not confirm this using the OP9-DL1 model system *in vitro*. A1-KD in the periphery led to diminished numbers of memory T cells and dendritic cells, indicating impaired T cell activation. Surprisingly, the constitutive A1-KD model did not display any of these phenotypes, possibly due to insufficient knock-down efficiency.

Although our work brought some insights into the role A1 might play in T cell immunity, it remains important to resolve the overall function of A1 in the immune system as it is involved in many human diseases and is therefore a potential target for new therapeutic strategies of autoimmunity and cancer. Due to the different results we obtained from the two A1-KD mouse models it is not easy to draw a

Abschlussberichte

formal conclusion about the function of A1 *in vivo*. Also, further investigations have to be performed to resolve the possibility of a cytotoxicity problem caused by tTA overexpression in certain cell types. This will be done by using proper double-transgenic controls expressing shRNA against the Renilla-type luciferase³⁷. However, we are also planning to do *in vitro* assays to analyze the impact of A1-deficiency on T cell activation, proliferation and apoptosis. I want to focus further on the role of A1 in inflammatory response as the high induction of A1 upon TCR-mediated T cell activation and the impaired onset of the EAE in VVA1.2 mice seem to be promising leads to follow up during my PhD studies.

As Mcl-1 is the closest relative of A1, it will also be interesting whether A1-KD in combination with heterozygous knockout of Mcl-1 brings new insights in the interaction and functionality of both pro-survival proteins that are frequently reported to fulfill similar functions.

Referenzenliste

1. Tomayko, M.M., et al., Expression of the Bcl-2 family member A1 is developmentally regulated in T cells. *Int Immunol*, 1999. **11**(11): p. 1753-61.
2. Mandal, M., et al., The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med*, 2005. **201**(4): p. 603-14.
3. Verschelde, C., et al., Overexpression of the antiapoptotic protein A1 promotes the survival of double positive thymocytes awaiting positive selection. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(7): p. 1213-21.
4. Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
5. Verschelde, C., et al., A1/Bfl-1 expression is restricted to TCR engagement in T lymphocytes. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(9): p. 1059-67.
6. Gonzalez, J., A. Orlofsky, and M.B. Prystowsky, A1 is a growth-permissive antiapoptotic factor mediating postactivation survival in T cells. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2679-85.
7. Herold, M.J., et al., The stability and anti-apoptotic function of A1 are controlled by its C terminus. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13663-71.
8. Adams, K.W. and G.M. Cooper, Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. *J Biol Chem*, 2007. **282**(9): p. 6192-200.
9. Akgul, C., et al., In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Letters*, 2000. **478**(1-2): p. 72-76.
10. Walzer, T., et al., Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 2704-11.
11. Grayson, J.M., et al., Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 3950-4.
12. Garcia, S., J. DiSanto, and B. Stockinger, Following the development of a CD4 T cell response *in vivo*: from activation to memory formation. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 163-71.
13. Chen, Q., et al., IL-2 Controls the Stability of Foxp3 Expression in TGF-β-Induced Foxp3+ T Cells In Vivo. *The Journal of Immunology*, 2011. **186**(11): p. 6329-6337.
14. Ottina, E., et al., Targeting anti-apoptotic A1/Bfl-1 by *in vivo* RNAi reveals multiple roles in leukocyte development in mice. *Blood*, 2012.
15. Opferman, J.T., et al., Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 2003. **426**(6967): p. 671-6.

16. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, BCL-XL-regulated apoptosis in T cell development. *International Immunology*, 1997. **9**(9): p. 1375-1384.
17. Bouillet, P., et al., BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature*, 2002. **415**(6874): p. 922-6.
18. Strasser, A., et al., Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. **91**(4): p. 1376-1380.
19. Yamaji, O., et al., The Development of Colitogenic CD4+ T Cells Is Regulated by IL-7 in Collaboration with NK Cell Function in a Murine Model of Colitis. *The Journal of Immunology*, 2012. **188**(6): p. 2524-2536.
20. Tischner, D., et al., Defective cell death signalling along the Bcl-2 regulated apoptosis pathway compromises Treg cell development and limits their functionality in mice. *J Autoimmun*, 2012. **38**(1): p. 59-69.
21. Shimizu, J., et al., Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 2002. **3**(2): p. 135-42.
22. Sojka, D.K., A. Hughson, and D.J. Fowell, CTLA-4 is required by CD4+CD25+ Treg to control CD4+ T-cell lymphopenia-induced proliferation. *European Journal of Immunology*, 2009. **39**(6): p. 1544-1551.
23. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol*, 2003. **15**(4): p. 430-5.
24. Huan, J., et al., Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res*, 2005. **81**(1): p. 45-52.
25. Weiss, J.M., et al., Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012. **209**(10): p. 1723-1742.
26. Hamasaki, A., et al., Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 1985-92.
27. Orlofsky, A., et al., Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *J Immunol*, 2002. **168**(4): p. 1840-6.
28. Tischner, D., et al., Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity. *Cell Death and Dis*, 2010. **1**: p. e48.
29. Mehrian, R., et al., Synergistic effect between IL-10 and bcl-2 genotypes in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(4): p. 596-602.
30. Hutcheson, J., et al., Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity*, 2008. **28**(2): p. 206-17.
31. Doreau, A., et al., Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 778-85.
32. Issazadeh, S., et al., Role of passive T-cell death in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. 1109-16.
33. Ludwinski, M.W., et al., Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1706-13.

Abschlussberichte

34. Ulleras, E., et al., NFAT but not NF-kappaB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells. *Blood*, 2008. **111**(6): p. 3081-9.
35. Cippa, P.E., et al., Resistance to ABT-737 in activated T lymphocytes: molecular mechanisms and reversibility by inhibition of the calcineurin-NFAT pathway. *Cell Death Dis*, 2012. **3**: p. e299.
36. Okuda, Y., M. Okuda, and C.C. Bernard, The suppression of T cell apoptosis influences the severity of disease during the chronic phase but not the recovery from the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J Neuroimmunol*, 2002. **131**(1-2): p. 115-25.
37. Premsrirut, Prem K., et al., A Rapid and Scalable System for Studying Gene Function in Mice Using Conditional RNA Interference. *Cell*, 2011. **145**(1): p. 145-158.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderungen

Weiterführung des Projekts mit Hilfe der Finanzierung durch ein DOC-Stipendium der Österreichischen Akademien der Wissenschaften (ÖAW).

Sonstiges

Masterarbeit Selma Tuzlak, „Impact of the Prosurvival Bcl-2 family member A1 on T cell Immunity“ an der Leopold Franzens Universität, Fakultät für Biologie, Masterstudium Molekularbiologie

Vesicular stomatitis virus pseudotyped with the glycoprotein of the lymphocytic choriomeningitis virus as an HIV vaccine vector

Dr.phil.nat. Janine Kimpel

Sektion für Virologie

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2012 – 31.10.2013

Zusammenfassung

Attenuierte Lebendimpfstoffe sind i.d.R. sehr effektiv und kostengünstig. Für Erkrankungen, für die es schwierig bis unmöglich ist, sichere Lebendimpfstoffe zu entwickeln, sind virale Vektorimpfstoffe eine vielversprechende Alternative. Allerdings induzieren virale Vektorimpfstoffe auch neutralisierende Antikörper gegen den Vektor selbst, so dass die Effizienz bei wiederholter Gabe deutlich nachlässt. In Impfschemata wird eine virale Vektorvakzine daher i.d.R nur einmal appliziert und mit DNA-, Protein- oder anderen viralen Vektorvakzinien kombiniert. Im Rahmen dieses Projektes haben wir den ersten, vermehrungsfähigen viralen Vakzinevektor entwickelt, der keine neutralisierenden Antikörper gegen den Vektor selbst induziert und daher in einem Impfschema als Prime und als Boost eingesetzt werden kann: das VSV-GP (Tober et al, 2014). VSV-GP ist das Vesikuläre Stomatitis Virus, in dem das Hüllprotein G gegen das Hüllprotein GP eines Arenavirus (LCMV) ausgetauscht wurde. In vorangegangenen Experimenten hatten wir gezeigt, dass VSV-GP im Mausmodell sehr sicher ist.

In VSV-GP bzw. in das Wildtypvirus VSV wurde an Position 5 im viralen Genom jeweils das Modellantigen Ovalbumin (OVA) eingefügt. Mit den resultierenden Viren VSV-GP-OVA und VSV-OVA wurden C57BL/6 Wildtypmäuse intramuskulär immunisiert und die Immunantwort gegen das Modelantigen Ova wurde untersucht. Nach der Prime-Immunisierung wurden für beide Vektoren vergleichbare Mengen an cytotoxische T-Zellen gegen OVA und anti-OVA Antikörpern gebildet. Interessanterweise konnten diese Immunantworten nur für VSV-GP-OVA nach einer zweiten Immunisierung gesteigert bzw. reinduziert werden, während für VSV-OVA die zweite Gabe wirkungslos war. Dieses Phänomen kann höchstwahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass für VSV-OVA schon nach der ersten Gabe hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen den Vektor selbst induziert werden. Im Gegensatz dazu wurden selbst nach 8 aufeinanderfolgenden Immunisierungen mit VSV-GP-OVA nur geringe Titer an Vektorneutralisierende Antikörper gebildet, die in einem in vitro Neutralisierungstest das Virus nicht komplett neutralisieren konnten. Die Immunogenität von VSV-GP-OVA war vergleichbar mit der eines adenoviralen Vektors (AdOVA), dem Goldstandard für virale Vektorvakzine. Beide Vektoren, sowohl VSV-GP-OVA als auch AdOVA, konnten Mäuse in einem Infektionsmodell mit Listerien, die Ova exprimierten, komplett schützen. Im Gegensatz dazu war nur ein Teil der mit VSV-OVA immunisierten Tiere geschützt.

Weiter wurde, um die Sicherheit und die Verpackungskapazität zu erhöhen, ein semi-replikatives srVSV-GP System etabliert. Dies besteht aus einem sich komplementierenden Paar aus zwei defekten VSV-Vektoren. Dabei wurde in dem einen Vektor das GP-Gen deletiert und stattdessen GFP als Marker gen eingefügt, während in dem zweiten Vektor das L-Gen gegen RFP ausgetauscht wurde. Diese Vektoren komplimentierten sich in vitro zu einem vermehrungsfähigen srVSV-GP System.

Abschlussberichte

Insgesamt konnten wir zeigen, dass sich VSV-GP sehr gut als viraler Vakzinevektor eignet. Dabei ist insbesondere die Eigenschaft des Vektors, dass keine neutralisierenden Antikörper gegen den Vektor gebildet werden und der Vektor dadurch auch bei wiederholter Gabe seine Wirksamkeit behält, für weitere Entwicklungen interessant. In nächsten Schritten sind wir dabei, Antigene von relevanten Pathogenen in VSV-GP zu klonieren und die Immunogenität und Effektivität der resultierenden Viren in Tiermodellen zu testen. Hierfür haben wir zwei Förderanträge eingereicht, einmal ein Einzelprojekt beim FWF und zum anderen ein Projekt im Rahmen der Bridge Frühphase Förderschiene der FFG, die sich beide noch in der Begutachtungsphase befinden. Die Ergebnisse dieses Projektes sind beim Journal of Virology zur Publikation eingereicht. Außerdem wurden die aus diesem Projekt resultierenden Daten auf 2 Kongressen als Vortrag und auf 4 als Poster präsentiert.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Tober, R.; Banki, Z.; Egerer, L.; Muik, A.; Behmuller, S.; Kreppel, F. et al. (2014): VSV-GP: a Potent Viral Vaccine Vector That Boosts the Immune Response upon Repeated Applications. In: *Journal of Virology* 88 (9), S. 4897–4907. (IF 5,076)

Externe Förderung

FFG, Bridge “BF: Evaluation of a semi-replication competent VSV system as HIV vaccine” (€ 392.900,00)
PI Dorothee Holm-von Laer.

Pathophysiology of Global Cerebral Edema in Subarachnoid Hemorrhage – A Cerebral Microdialysis Study

Anelia Dietmann, MD, PhD
Universitätsklinik für Neurologie

3 Antragsperiode

Berichts/Förderzeitraum: 14.04.2011-14.04.2013

Zusammenfassung

Pathophysiology of Early Brain Injury in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Patients - A Microdialysis Study

Background:

Aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH) is still associated with a high morbidity and mortality. A substantial amount of evidence from animal models indicates that early brain injury may play an important role in the patient's outcome. Underlying pathophysiologic mechanisms are still incompletely discovered in patients with aSAH and are currently not targeted as specific treatment endpoints. Cerebral microdialysis allows online measurement of brain metabolic changes and extracellular proteins including the proinflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) and the gelatin matrix metallopeptidase 9 (MMP-9).

Methods:

Twenty-six aSAH patients with multimodal neuromonitoring were analyzed in a prospective observational cohort study. Daily cerebral microdialysates were additionally analyzed for IL-6 and MMP-9 using enzyme linked immunosorbent assays. Statistical analysis was performed using a generalized estimating equation with an autoregressive function to handle repeated observations within a subject.

Results:

In the first 24 hours the patient's metabolic CNS profile revealed brain metabolic distress and an excitatory response significantly improving over the following 5 days ($P<0.001$).

Moreover we observed an increased glucose consumption reflected by a significant decrease of brain extracellular glucose concentration ($P=0.001$). Brain tissue hypoxia ($PbtO_2 < 20\text{ mmHg}$) was observed in $>60\%$ of neuromonitoring time in the first 24 hours (median=15mmHg, IQR=5-22) and improved thereafter ($P<0.05$). Baseline IL-6 was elevated in all patients at the day of bleeding (median=4059pg/ml, IQR=1316-12456) and significantly decreased over the next 5 days ($P<0.01$). Baseline MMP-9 was initially elevated (median=851pg/ml, IQR=98-25860) and significantly decreased within 36 hours ($P<0.05$). A higher proinflammatory response was associated with the development of delayed cerebral ischemia ($P=0.04$), whereas loss of consciousness at ictus, admission disease severity and early brain tissue hypoxia were associated with higher MMP-9 levels ($P<0.03$).

All models were adjusted for probe location, aneurysm securing and disease severity as appropriate. Admission GCE was associated with brain metabolic distress ($P=0.01$) and a higher intracranial pressure ($P=0.004$) but not with IL-6 and MMP-9.

Conclusion:

In this study we could confirm pathophysiologic mechanisms of early brain injury for the first time in patients with aneurysmal SAH, reflected by a brain extracellular proinflammatory response, MMP-9

Abschlussberichte

upregulation and cerebral metabolic distress. These results need to be confirmed in a larger cohort and may be used as endpoints for future interventions targeting EBI in poor grade SAH patients.

Delayed Neuroinflammation In Patients With Poor-grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Is Associated With Intracerebral Hemorrhage Volume, Brain Metabolic Derangement and Unfavorable Outcome

Background:

Animal data suggest an association between delayed neuroinflammation and secondary brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage (aSAH). We sought to study the relevance of delayed neuroinflammation in poor grade aSAH patients.

Methods:

Prospectively collected data of 26 consecutive poor-grade aSAH patients with multimodal neuromonitoring including cerebral microdialysis (CMD) were retrospectively analyzed for interleukin (IL)-6 levels and correlated with brain metabolic and cerebral hemodynamic parameters averaged over the CMD collection time. Patients were dichotomized to high- grade (N=10) and low-grade (N=16) neuroinflammation by their median CMD-IL-6 levels 4- 10 days after bleeding. Data were analyzed using a generalized linear model extended by generalized estimating equations to account for time series data.

Results:

Admission variables associated with high-grade delayed neuroinflammation included perilesional probe location ($P=0.02$) and intracerebral hemorrhage (ICH) volume ($P=0.003$). High-grade neuroinflammation was associated with delayed cerebral infarction ($P=0.001$) and intracerebral hemorrhage (ICH) volume during invasive neuromonitoring ($P=0.03$). High- grade neuroinflammation was linked to metabolic distress (LPR>40; $P=0.001$) and unfavorable outcome (modified Rankin Scale>4) three months ($P=0.01$) after ictus, independently from probe location, initial Hunt&Hess grade and age.

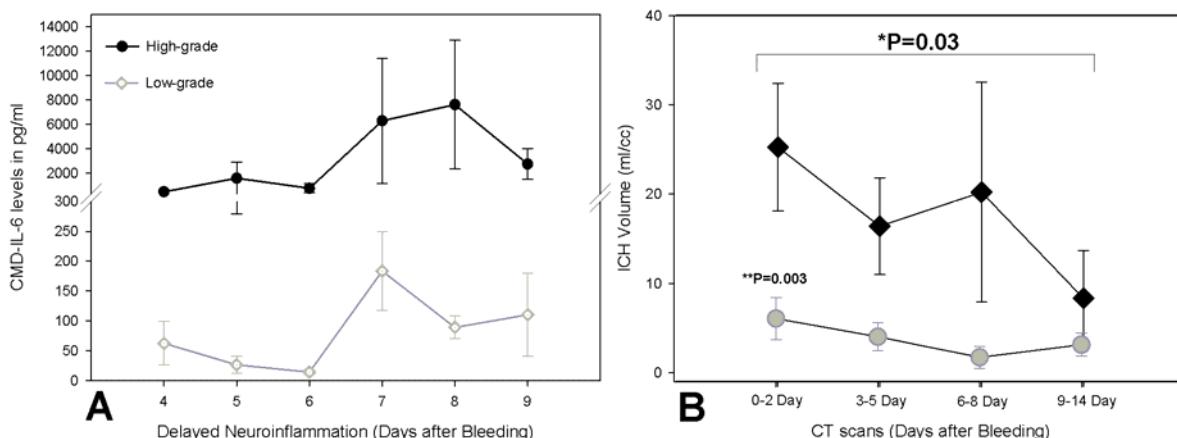


Figure 1: (A) illustrating delayed neuroinflammation after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: CMD-IL-6 levels of patients with high-grade (□) vs. low-grade (○) neuroinflammation ($P=0.000$) (B) ICH volume at admission ($P=0.003$) and at follow-up CT scans was higher in patients with high-grade (♦) vs. low-grade (□)neuroinflammation ($P=0.03$).

CMD-IL-6, cerebral microdialysis interleukin-6; ICH, intracerebral hemorrhage.

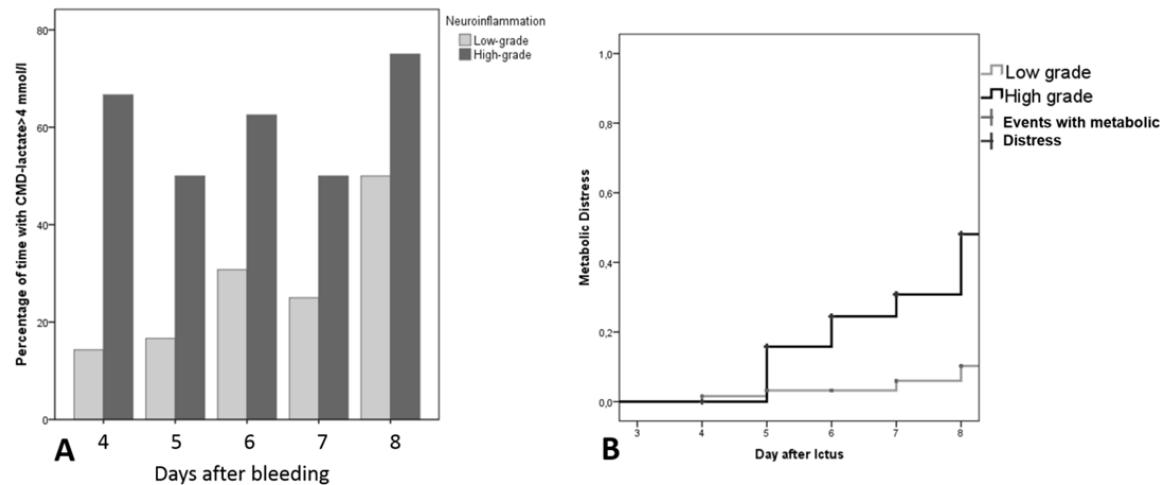


Figure 2: (A) demonstrating the percentage of time with lactate $>4\text{ mmol/L}$ per 24h in patients with delayed neuroinflammation (high-grade=black bars; low-grade=bright bars)
(B) relative frequency of events with metabolic distress in patients with high-grade (dark grey) compared to low-grade (bright grey) delayed neuroinflammation.

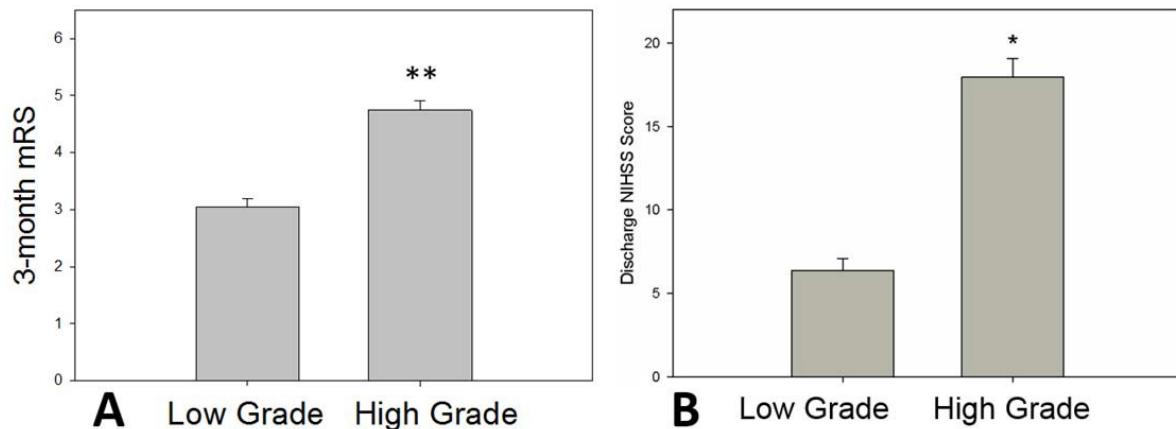


Figure 3: Patients outcome and delayed neuroinflammation: (A) illustrating 3-month mRS in patients with high-grade compared to low-grade neuroinflammation. (B) NIHSS score at discharge was significantly higher in patients with high-grade neuroinflammation.

mRS, modified Rankin Scale; CMD-IL-6, cerebral microdialysis interleukin-6; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale;

Conclusion:

Delayed neuroinflammation is associated with ICH volume, deranged cerebral metabolism and unfavorable outcome in poor-grade aSAH patients. The importance of this finding and the potential clinical implication should be proven in larger studies integrating multimodal neuromonitoring parameters.

Manuscripts in preparation:

Abschlussberichte

- Pathophysiology of Early Brain Injury in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Patients - A Microdialysis Study
- Delayed Neuroinflammation In Patients With Poor-grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Is Associated With Intracerebral Hemorrhage Volume, Brain Metabolic Derangement and Unfavorable Outcome

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

Sonstiges

ANIM January 2014, Hannover

Annual Neurocritical Care Society Meeting October 2013, Philadelphia, USA

International Symposium in Intensive Care and Emergency Medicine, Bruxelles March 2014

Galleria mellonella* as a host model to study invasive fungal infections due to *Mucorales

Mag. rer. nat. Ulrike Binder, PhD;
Division of Hygiene and Medical Microbiology

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 1.8. 2012 – 31.12. 2014

Zusammenfassung

Overall aim

The aim of these studies was to establish and characterize a simple alternative *in vivo* model to study fungal infections due to *Mucorales*, to test the efficacy of antifungal substances and to study the immune response of the *Galleria* larvae due to antifungal treatment.

Key results

1. Establishing *G. mellonella* as an infection model for Mucorales.

To utilize *G. mellonella* larvae as a model for *Mucorales* infections and to compare virulence potential within clinical relevant *Mucorales*, first, the optimal conidial dosage for virulence testing was determined, autoclaved conidia were used as additional controls to rule out that killing of larvae is due only to physical effect of foreign particles. The dose- and temperature-dependency of killing indicated that *G. mellonella* larvae have the potential to serve as a non-vertebrate animal host model for *Mucorales* infections. Further, active fungal growth within the host was detected in tissue sections of larvae infected *R. arrhizus* (Figure below). Histological examination of infected larvae was done in collaboration with Prof. Patrizia Moser, Institut für Pathologie, MUI.

2. Mucorales exhibited inter-generic dependent virulence potential in *G. mellonella*.

Significant differences in virulence potential within the genera tested was determined, while intra-species variances were marginal and, further, no significant differences could be detected due to isolate origin (clinical or environmental).

In summary, *Mucorales* can be classified in three groups according to their virulence potential: (1) the highly virulent species *R. arrhizus* and *R. microsporus*, (2) moderately virulent species *M. circinelloides*, and (3) *L. corymbifera*, *L. ramosa* and *RM. pusillus* exhibiting low virulence potential with the inoculum tested. Ability to cause disease and death was dependent on the viability of the fungal spores since infection with heat-inactivated spores caused no mortality and only marginal melanization.

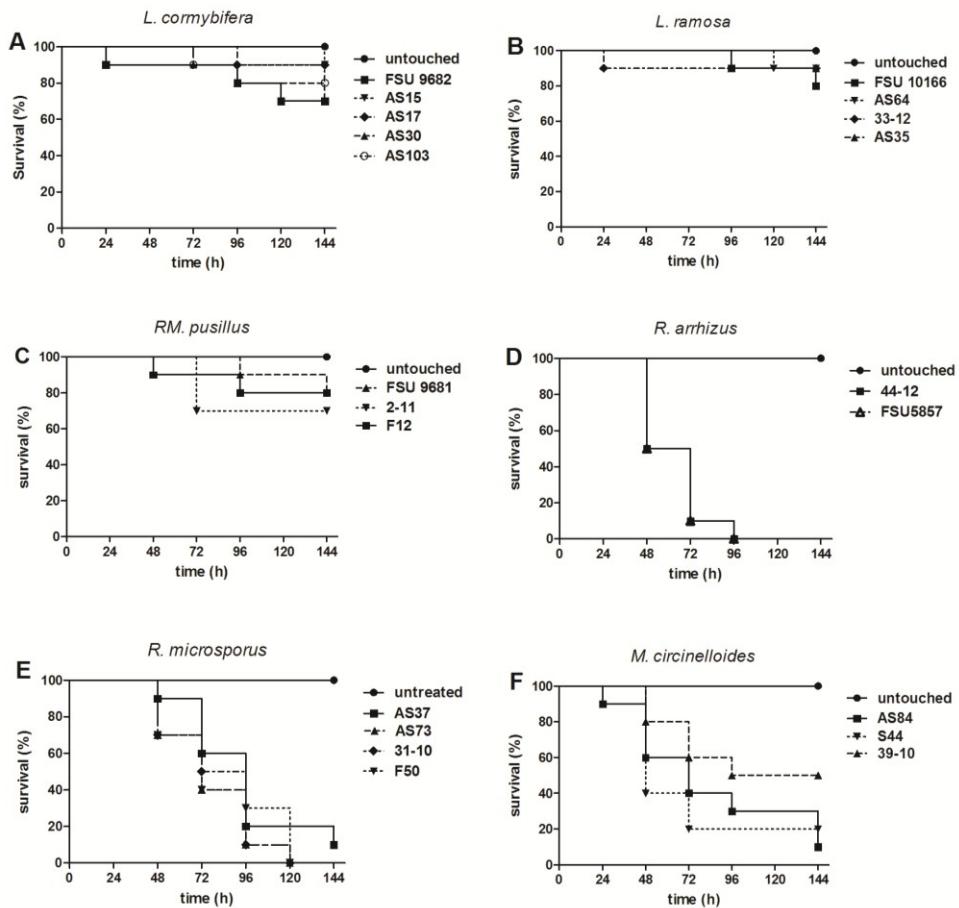


Figure 1. Survival of *G. mellonella* larvae following inoculation with different Mucorales. Larvae were infected with 1×10^6 conidia of *L. corymbifera* (A), *L. ramosa* (B), *RM. pusillus* (C), *R. arrhizus* (D), *R. microsporus* (E) and *M. circinelloides* (F) and incubated at 30°C. Survival was monitored every 24 h over 6 days (144 h). Kaplan-Meyer curves represent one out of three experiments.

For further proof, tissue sections of larvae infected with one representative isolate of each class of virulence potential were analyzed. Strains that exhibited high virulence potential were found to germinate and grow within the larval host (Figure 2, arrows). Hyphal elements within the larval body were detected, showing that *R. arrhizus* and

M. circinelloides are able to proliferate and kill larvae through an active infection mechanism, while *L. corymbifera* was not able to germinate and only conidia were detected.

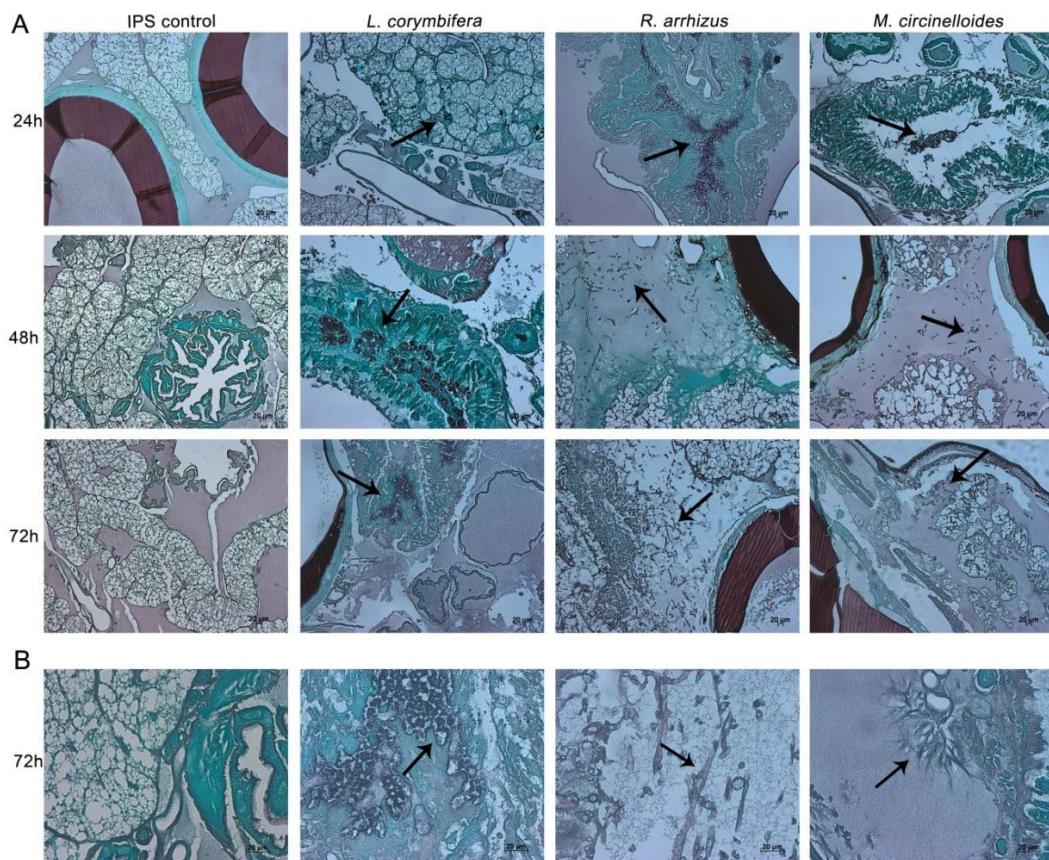


Figure 2. Histopathology of *G. mellonella* larvae infected with *L. corymbifera*, *R. arrhizus* and *M. circinelloides*. (A) Larvae were infected with IPS or 1×10^6 spores per larvae of each strain, respectively. Larvae were sacrificed at 24 h, 48 h and 72 h, embedded in paraffin and tissue sections were stained with Grocott's silver stain. (B) Enlarged figure of tissue sections (72 h post infection). Arrows indicate fungal growth.

3. Establishing *Galleria* larvae as a tool for antifungal treatment studies.

For efficacy testing of antifungals *in vivo* a spore concentration known to be able to cause disease was chosen for each strain and concentrations of antifungal agents were chosen according to their MIC values.

In brief, L-AMB (liposomal amphotericinB), which demonstrated best activity *in vitro*, showed no significant improvement in the survival of infected larvae, except for those infected with *L. corymbifera* (30% better outcome after 144 h post infection), although improvement did not reach significance. Outcome in L-AMB treatment did not reflect *in vitro* antifungal susceptibility. To investigate pharmacokinetic properties of a single dose of L-AMB in the larvae and to determine the concentration of L-AMB in the larval haemolymph, an agar well diffusion assay was performed. A decrease in the L-AMB activity within the larval haemolymph during time course of injection was detected, which might explain low efficacy of L-AMB.

Application of POS (posaconazole) prolonged survival of larvae infected with *L. corymbifera*, *L. ramosa* and *R. microsporus*, while no improvement was detected for larvae infected with *R. arrhizus*, *M.*

Abschlussberichte

circinelloides and *RM. pusillus*. Failure in the therapy for *M. circinelloides* infection correlated with MICs higher than for other Mucorales.

Best *in vivo* efficacy was detected for NYT-IL (nystatin-intralipid), a kind gift of Prof. Segal, Israel University. Except for *R. arrhizus*, all Mucorales demonstrated prolonged survival with NYT-IL treatment. Best treatment outcome was visible for larvae infected with *Lichtheimia* spp.

Summarizing, we conclude that *G. mellonella* is a useful tool to study antifungal efficacy against mucormycosis *in vivo*. Failure in *in vivo* outcome could be due to single dose administration. Treatment with higher concentrations has to be investigated and may improve the therapeutic outcome of infected larvae.

4. Analysis of the effect of L-AMB treatment on larval immune response: expression of haemolymph proteins and changes in haemocyte densities.

To determine the influence of L-AMB on the *G. mellonella* proteomic response, haemolymph of L-AMB injected larvae was analyzed by 2D SDS-PAGE. Spots of interest were identified by LC-MS. Some proteins with known immune function showed altered expression following L-AMB treatment; however, fold change increase did not exceed 2. 2D SDS-PAGE was done in collaboration with the group of Kevin Kavanagh at the National University of Ireland. Furthermore, we could detect a significant ($P < 0.05$) increase in haemocyte density in L-AMB treated larvae, 24 h after administration, indicating immunmodulatory effects of L-AMB on cellular level.

Manuscripts submitted and in preparation

1. Ulrike Binder, Elisabeth Maurer, Cornelia Lass-Flörl. ***Galleria mellonella*: an invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species.** Fungal Biology (June 2015)
2. Elisabeth Maurer*, Caroline Hörttnagl*, Verena Naschberger, Patrizia Moser, Rita Semis, Ester Segal, Cornelia Lass-Flörl and Ulrike Binder. **Pathogenicity of Mucorales and antifungal efficacy testing in the alternative host *Galleria mellonella*.** Manuscript in preparation
3. Kaerger K, Schwartze V, Dolatabadi S, Nyilasi I, Kovác S, Binder U, Papp T, de Hoog S, Jacobsen I, Voigt K. **Adaptation to thermotolerance in *Rhizopus* coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny, physiological and metabolic flexibility.** Virulence 2015 May 19;6(4):395-403.
4. Elisabeth Maurer, Niall Browne, Carla Surlis, Emina Jukic, Patrizia Moser, Kevin Kavanagh, Cornelia Lass-Flörl and Ulrike Binder. ***Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B treatment.** Virulence 2015 Jun 24:1-8.

The data obtained in this study are currently summarized in the second manuscript mentioned, which will be sent to co-authors for approval before it will be submitted (2). Furthermore, the great possibility to present the obtained data of this study to the scientific community at international meetings resulted in the invitation to write a review on *Galleria mellonella* as a model for fungal infections, which has been submitted recently (1). Additionally, building up this model system for Mucorales infections at our institution, enabled me to collaborate with internationally well-known scientists in

the field, resulting in a publication currently in revision for *Virulence* (3).

Furthermore, the knowledge we obtained by establishing this model system here in our department, allowed us to extend the species-repertoire of fungal pathogens to be tested, which lead to a joint publication with the group of Kevin Kavanagh at the National University of Ireland (4)

People involved in the study and their personal development

The funding resources of this grant allowed me to partly finance material for Master and Bachelor- Projects done in our group:

1. Manuela Sparber (Msc.Biol.) Empfindlichkeitsprofil humanpathogener Pilze unter hypoxischen Testbedingungen und Etablierung eines alternativen Tiermodells
2. Caroline Hörtnagl (Master FHG). Virulence and antifungal susceptibility of Mucormycotina – *in vitro* and *in vivo* models.
3. Sabrina Foidl (Bak.FHG.) *Galleria mellonella* als alternatives Tiermodell für *Scedosporium* & Mucorales Infektionen
4. Elisabeth Maurer (PhD). Elisabeth was successful in acquiring an “i-med Auslandsstipendium” which allowed her to spend one month in Kevin Kavanagh’s group in Ireland to perform 2D gel analysis. Parts of her PhD thesis dealt with establishing the model for other fungal pathogens than Mucorales.

For myself, having the possibility to carry out this study resulted in many new and very fruitful collaborations – international ones as well as within the Medical University of Innsbruck, which is reflected in the publications we could submit by the end of the two years of this project.

Collaborators are:

- Patrizia Moser, Institut für Pathologie, MUI.
- Kevin Kavanagh & group, National University of Ireland Esther Segal, Tel Aviv University, Israel.
- Sybren de Hoog, CBS KNAW fungal biodiversity center, The Netherlands Kerstin Voigt & group HKI Jena, Germany.
- Kerstin Kärger, Nationales Referenzzentrum für Invasive Pilzinfektionen, Leibnitz Institute Jena, Germany.

As already mentioned above, our knowledge obtained was extremely useful to set up the model for other species as well, which again led to co-authored publications beyond this project, e.g. in collaboration with the group of Hubertus Haas, Division of Molecular Biology; and within our own division.

1. Beckmann N, Schafferer L, Schrettler M, Binder U, Talasz H, Lindner H, Haas H. Characterization of the link of Ornithine, Arginine, Polyamine and Siderophore Metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *Plos One* 2013 Jun 18;8(6).
2. Schafferer L, Beckmann N, Binder U, Brosch G, Haas H. AmcA - a mitochondrial ornithine transporter involved in fungal siderophore biosynthesis. *Frontiers in Microbiology*, 2015 Apr 7;6:252.
3. Michael Blatzer, Gerhard Blum, Emina Jukic, Wilfried Posch, Peter Gruber, Markus Nagl,

Abschlussberichte

Ulrike Binder, Elisabeth Maurer, Bettina Sarg, Herbert Lindner, Cornelia Lass- Flörl, and Doris Wilflingseder. Blocking Hsp70 enhances the efficiency of Amphotericin B treatment in resistant *Aspergillus terreus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2015 Jul;59(7):3778-88

Furthermore, the successful establishment of *Galleria mellonella* as a model system for Mucorales will be of great advantage for the recently granted “CD-Labor” – CD-Fungus (CD- Labor für invasive Pilzinfektionen: innovative Diagnose, optimierte Therapie und sichere Prävention) to Prof. Cornelia Lass-Flörl, in which we plan to further exploit the *Galleria* model to gain a deeper insight into the pathobiology of fungal infections caused by Mucorales in the next years.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Binder, Ulrike; Maurer, Elisabeth; Lass-Flörl, Cornelia (2015): *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. In: *Fungal Biology*, In press. (IF 2,342)

Maurer, Elisabeth; Browne, Niall; Surlis, Carla; Jukic, Emina; Moser, Patrizia; Kavanagh, Kevin et al. (2015): *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. In: *Virulence*, S. 1–8. (IF 4,216)

Externe Förderungen

FWF DACH Antrag gestellt: Interaktionen des Immunsystems mit Mucorales

Effects of the Erythropoietin-analogue ARA290 on the course of chemically-induced colitis

Dr. med. univ. Manfred Nairz PhD
Universitätsklinik für Innere Medizin VI

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2012 – 31.07.2014

Zusammenfassung

In gegenständlichem Projekt wurden die Effekte des Erythropoietin-Analogons ARA290 auf die Effektorfunktion von Makrophagen in vitro und auf den Verlauf einer experimentell induzierten Kolitis in vivo untersucht.

Interessanterweise hat sich gezeigt, dass ARA290 entzündungshemmende Effekte auf Makrophagen, die durch Entzündungsmediatoren aktiviert wurden, ausübt. Konkret hemmt ARA290 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p65. Dieser stellt eine entzündungsfördernde Untereinheit aus der Familie der NF-κB Transkriptionsfaktoren dar und spielt in der Inflammation eine zentrale Rolle. Für die Wirkung von ARA290 auf Inflammation im Allgemeinen und p65 im Speziellen ist die Janus-Kinase JAK2 notwendig, die in die Signalübertragung vom Erythropoietin-Rezeptor an der Zelloberfläche auf intrazelluläre Signalwege eingeschaltet ist. Dies konnte mit JAK2-Inhibitoren getestet und mit primären JAK2-defizienten Makrophagen bestätigt werden. Bei Hemmung oder Abwesenheit von JAK2 kann ARA290 keine entzündungshemmenden Effekte entfalten.

Im Tiermodell der mit der Chemikalie DSS induzierten experimentellen Kolitis, das chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Mb. Crohn und Koliitis ulzerosa nachahmt, führt ARA290 zu milderem Krankheitsverlauf, geringerem Gewichtsverlust und weniger Gewebeschädigung. Dies geschieht unabhängig von einer möglichen erythropoietischen Aktivität. De facto konnten wir zeigen, dass ARA290 keine Wirkung auf die Entwicklung von erythropoietischen Vorläuferzellen hat.

ARA290 ist somit von möglichem therapeutischen Nutzen bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen und verspricht neben hoher Wirksamkeit eine geringe Nebenwirkungsrate, da keine thromboembolischen Komplikationen zu erwarten sind, wie dies bei Erythropoietin selbst zu erwarten wäre.

Überraschungen

Die im Projektverlauf aufgetretenen Überraschungen sind teils molekularbiologischer und teils immunologischer Natur.

Aus molekularbiologischer Sicht ist uns und anderen Arbeitsgruppen aufgefallen, dass die Chemikalie DSS enzymatische Reaktionen wie reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion hemmt. Damit wird die Analyse der messenger RNA (mRNA) Expression von immunologisch relevanten und anderen Genen erschwert. Dies ist nicht nur im Darm, sondern auch in anderen Organen der Fall. Offenbar häuft sich DSS nach oraler Gabe auch in der Leber an. Dieses Problem konnte jedoch durch eine stringentere Methode der mRNA Isolation unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit) umgangen werden.

Abschlussberichte

Die unerwarteten immunologischen Ergebnisse sind darin begründet, dass primäre JAK2-defiziente Makrophagen auf Entzündungsmediatoren wie Lipopolysaccharid anders als Wildtyp-Makrophagen reagieren und weniger Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-6 (IL-6) bilden. Dies könnte auf eine selbstverstärkender Signalschleife von IL-6, dessen Rezeptor und JAK2 schließen lassen. Diese Schleife könnte JAK2-defizienten Makrophagen fehlen, sodass sie weniger IL-6 produzieren. Dieser Hypothese gehen wir in weiterführenden Experimenten auf den Grund.

Mögliche Erfolgsberichte

Unsere präliminären Ergebnisse wurden in Form eines Posters am ‚Comprehensive Center for Infection, Immunity and Transplantation‘ Science Day 2013 in Innsbruck und in Form eines Vortrags am ‚European Macrophage and Dendritic Cell Society‘ Meeting 2013 in Erlangen vorgestellt und jeweils positiv aufgenommen.

Wir rechnen mit einer Veröffentlichung unserer Ergebnisse im Jahr 2015 und glauben an entsprechend positive Resonanz vonseiten wichtiger Zeitschriften.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Nairz, Manfred; Schroll, Andrea; Demetz, Egon; Tancevski, Ivan; Theurl, Igor; Weiss, Günter (2015): 'Ride on the ferrous wheel'—the cycle of iron in macrophages in health and disease. In: *Immunobiology* 220 (2), S. 280–294. (IF 3,044)

Externe Förderung

Sonstiges

Poster, präsentiert am ‚Comprehensive Center for Infection, Immunity and Transplantation‘ Science Day 2013 in Innsbruck.

BolA – a transcriptional regulator required for stress adaptation in *A. fumigatus*?

MMag. Michael Blatzer, Ph.D.
Division of Molecular Biology

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2011 – 31.07.2014

Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus, an opportunistic human fungal pathogen, became one of the most common air-borne fungal pathogens of humans during the last decades. Depending on the host immune status, clinical manifestations range from allergic reactions to life-threatening invasive disease, termed aspergillosis, particularly in immuno-compromised patients. The current difficulties in diagnosis and treatment of aspergillosis are reflected by the high mortality rate (40-90%) of this infectious disease (1). During both saprophytic and pathogenic growth, this opportunistic pathogen has to cope with rapidly changing microenvironments. Therefore, *A. fumigatus* is able to adapt its metabolism in order to overcome nutrient limitation and various host defense mechanisms.

Virtually all organisms require iron as an indispensable cofactor for various metabolic processes. *A. fumigatus* employs two high-affinity iron uptake mechanisms: (I) siderophore (low molecular mass iron chelators) mediated iron uptake and (II) reductive iron assimilation (2-4).

Biosynthesis of siderophores, but not reductive iron assimilation, proved essential for full pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* in various virulence models including murine models of pulmonary and cutaneous aspergillosis, *Drosophila melanogaster*, and the wax moth *Galleria mellonella* (5). Previous studies identified numerous genes involved in iron uptake and regulation (3, 6-8). However, the mode of iron sensing remains elusive. In *S. cerevisiae*, which employs entirely different iron regulators, the protein BolA was shown to be involved in iron sensing (9).

BolA homologs are present in most prokaryotes and eukaryotes, however little is known about the gene function. In the course of an FWF project-funded study (FWF P21643-B11 to ao. Prof. Hubertus Haas), inactivation of BolA was found to cause iron-dependent phenotypic alterations in *A. fumigatus*. The objective of the proposed project was the functional characterization of BolA, in particular the investigation of its role in iron metabolism and general adaptation to stress, which is crucial for pathogenicity of *A. fumigatus*.

Protein sequence analyses revealed the presence of a ubiquitous BolA domain, rendering AFUA_6G12490 as a member of the BolA protein family. Biological functions of BolA domain proteins in higher eukaryotes including *A. fumigatus* are largely unknown.

It is very likely that such a conserved domain might be involved in diverse cellular functions depending on its context. Commonly, BolA proteins display a helix turn helix motif as major structural feature with an ability to bind DNA.

A BolA homolog has been shown to be located in the cytoplasma in *S. cerevisiae* and to interact with the cytoplasmic monothiol glutaredoxins Grx3 and Grx4 (9) In *S. cerevisiae*, this BolA homolog has been named Fra2 and, together with Grx3/4 and another protein (Fra1), it is involved in the regulation of the iron regulon via the nucleo-cytoplasmatic shuttling of the transcription factor Aft1. The human BolA3 has recently been implicated in the biogenesis of [Fe-S] clusters for oxidative phosphorylation complexes and 2-oxo acid dehydrogenase enzymes in mitochondria (10).

Results

BolA-deficiency decreases siderophore levels

The *A. fumigatus* *bolA*-null mutant, termed $\Delta bolA$, was characterized in this study. Strains deficient in BolA displayed altered siderophore contents. Interestingly the intracellular siderophore ferricrocin (FC) was decreased more than 3-fold compared to the wild type in all tested condition (table 1). The extracellular siderophores TAFC and FsC displayed conversed levels. TAFC was decreased under all tested conditions in the BolA-deficient strain by 6 to 3-fold. FsC, the chemically less stable precursor of TAFC, in contrast was increased in $\Delta bolA$ under most conditions.

Table 1: Content of extra and intracellular siderophores of the BolA-deficient strain ($\Delta bolA$) and the wildtype (wt). Values are normalized to the dry weight of the cultures and are given as AU at 440 nm for TAFC and FsC and 434 nm for FC.

condition	strain	TAFC	FsC	FC
24h 37°C	$\Delta bolA$	0.07 ± 0.001	0.04 ± 0.000	0.11 ± 0.002
	wt	0.45 ± 0.012	0.03 ± 0.000	0.33 ± 0.004
ratio wt/ $\Delta bolA$		6.43	0,75	3
48h 37°	$\Delta bolA$	0.54 ± 0.024	0.18 ± 0.021	0.28 ± 0.014
	wt	2.84 ± 0.075	0.07 ± 0,001	1.10 ± 0.018
ratio wt/ $\Delta bolA$		5.26	0.39	3.93
48h 25°C	$\Delta bolA$	0.01 ± 0.002	0.02 ± 0.008	0.12 ± 0.006
	wt	0.34 ± 0.013	0.02 ± 0.013	0.43 ± 0.008
ratio wt/ $\Delta bolA$		3.4	1	3.58

Due to these alterations in siderophore content, siderophore biosynthetic genes were analysed at a transcriptional level by northern blot analysis (figure 1). Consistent with the content of extracellular siderophores, the transacylase *sidF*, required for FsC and TAFC synthesis, was up-regulated in $\Delta bolA$ at 37°C and in a temperature shift for 6h to 25°C. The TAFC specific acetyltransferase *sidG*, which triacetylates FsC, was down-regulated in the mutant but increased in the wt in the temperature shift. The TAFC specific transporter, *mirB*, was decreased in $\Delta bolA$, but up-regulated in the temperature shift in both strains, highlighting a rapid adaptation to temperature changes and elevated transcript levels of siderophore biosynthetic and up-take related genes in the wild type.

Iron starvation leads to the induction of the bZip-transcription factor HapX in *Aspergillus fumigatus*, which represses iron-consuming pathways such as heme biosynthesis, respiration, and ribosome biogenesis to spare iron. Furthermore HapX activates siderophore biosynthesis by coordinating siderophore biosynthesis with the precursor ornithine. HapX is up-regulated at a transcriptional level in $\Delta bolA$ (Fig. 1), especially in the temperatre shift. The majority of iron consuming pathways, e.g. heme biosynthesis, iron sulphur cluster biosynthesis, respiration, TCA cycle, is localized in the mitochondria and repressed by HapX under iron limited conditions.

Interestingly, the $\Delta bolA$ mutant displays a distinct transcriptional pattern of iron consuming genes. Genes of the heme biosynthetic pathway, which reside in the mitochondria, i.e. *hemA* (alpha-aminolevulinate synthase) and *heme9* (coproporphyrinogen oxidase), are up-regulated in the *bolA*-deficient strain under iron limitation in the temperature shift, but down-regulated under iron repleted conditions (Fig.1). This diverse pattern brought us to investigate heme and protoporphyrin IX levels (see 2).

Aconitase (*acoA*) as iron-sulfur cluster requiring enzyme of the TCA cycle was higher expressed in $\Delta bolA$ under iron limitation, indicating a different regulatory circuit in the *BolA*-deficient strain. Cytochrome C, *cycA*, transcript levels were altered under iron repleted conditions in the *BolA* deficient strain, suggesting alterations in respiratory activities caused by *BolA*-deficiency.

This regulation pattern of siderophore and heme biosynthetic genes suggested a significant role of *BolA* as transcriptional regulator of the iron and the heme regulon; reinforced by the distinct increase of the transcriptional regulator *HapX* in the temperature shift.

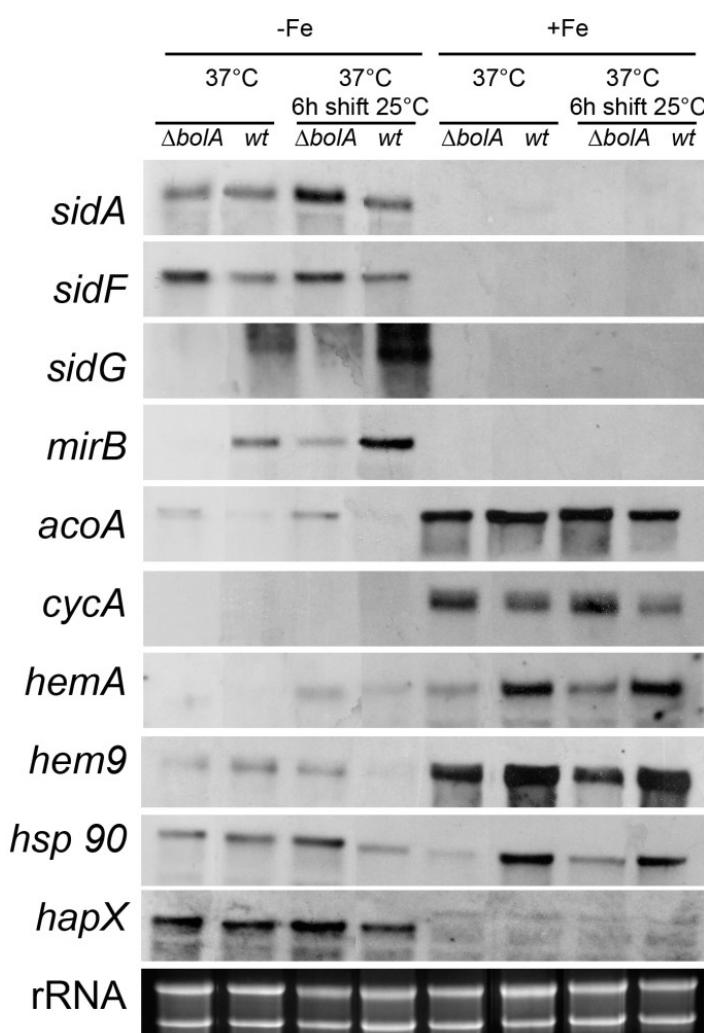


Figure 1. *BolA*-deficiency affects expression of siderophore and heme biosynthetic genes. Strains were cultured under iron limitation (-Fe) or iron repleted conditions (+Fe, FeSO₄ 30 µM) for 24h. Cultures used in the temperature shift experiments were incubated for 18 h at 37°C followed by 6 h incubation at 25°C.

BolA-deficiency increases heme levels and results in excessive protoporphyrin IX accumulation under iron limitation

Due to the differentially regulated transcript levels in $\Delta bolA$, heme and protoporphyrin IX (PPIX) levels in $\Delta bolA$ and wt mycelia were analysed by reversed phase HPLC. Interestingly heme levels were increased in $\Delta bolA$ in all tested conditions. PPIX, however, was only increased under iron-depleted conditions (Tab. 2). PPIX accumulation in $\Delta bolA$ could be visualised microscopically due to the red auto-fluorescence of PPIX (Fig. 2). These data indicate a derepression of heme biosynthesis caused by the loss of BolA

Table 2. $\Delta bolA$ displays elevated heme levels regardless of the iron availability and accumulates PPIX under iron limitation.

	PP IX [pmol/mg protein]		heme [pmol/mg protein]	
condition	24h -Fe	24h +Fe	24h -Fe	24h +Fe
$\Delta bolA$	3403.72 ± 794.11	36.85 ± 5.37	137.11 ± 23.07	399.83 ± 45.86
wt	565.94 ± 4,56	50.11 ± 3.34	77.28 ± 17.68	239.71 ± 33,38
ratio $\Delta bolA$ /wt	6.014	0.735	1.774	1.668

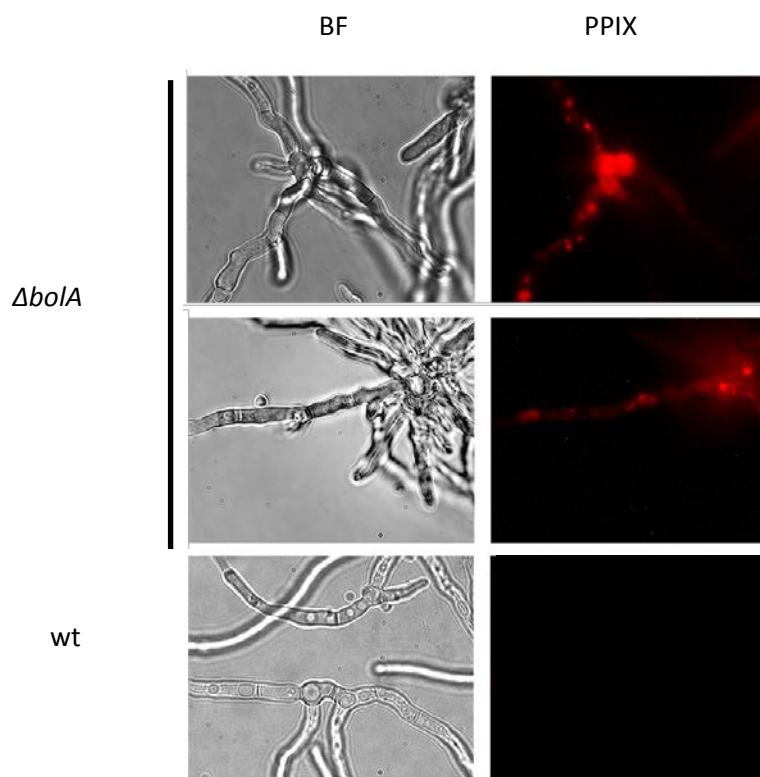


Fig. 2. $\Delta bolA$ accumulates PPIX under iron limiting conditions. PPIX is visualized by its red auto-fluorescence.

BolA deficiency increases susceptibility to ROS inducing agents

The BolA-deficient strain displayed a reduced radial growth on plates regardless of the iron supply, this effect was even more pronounced at ambient temperatures. In an additional experiment, the susceptibility of the mutant to ROS inducing agents was tested. $\Delta bolA$ exhibited an increased susceptibility to the ROS inducing agents H₂O₂ and the redox cycler paraquat. The susceptibility to H₂O₂ was slightly increased in the BolA deficient strain at 37°C, but was more pronounced at 25°C.

Paraquat causes extensive mitochondrial oxidative damage and complex I of the mitochondrial respiratory chain has been shown to be the major site of paraquat induced superoxide production (11). Susceptibility to paraquat was increased in $\Delta bolA$ and no growth of the mutant could be observed in the diffusion tests at 25°C, indicating a role of BolA in mitochondrial function (Fig.3)

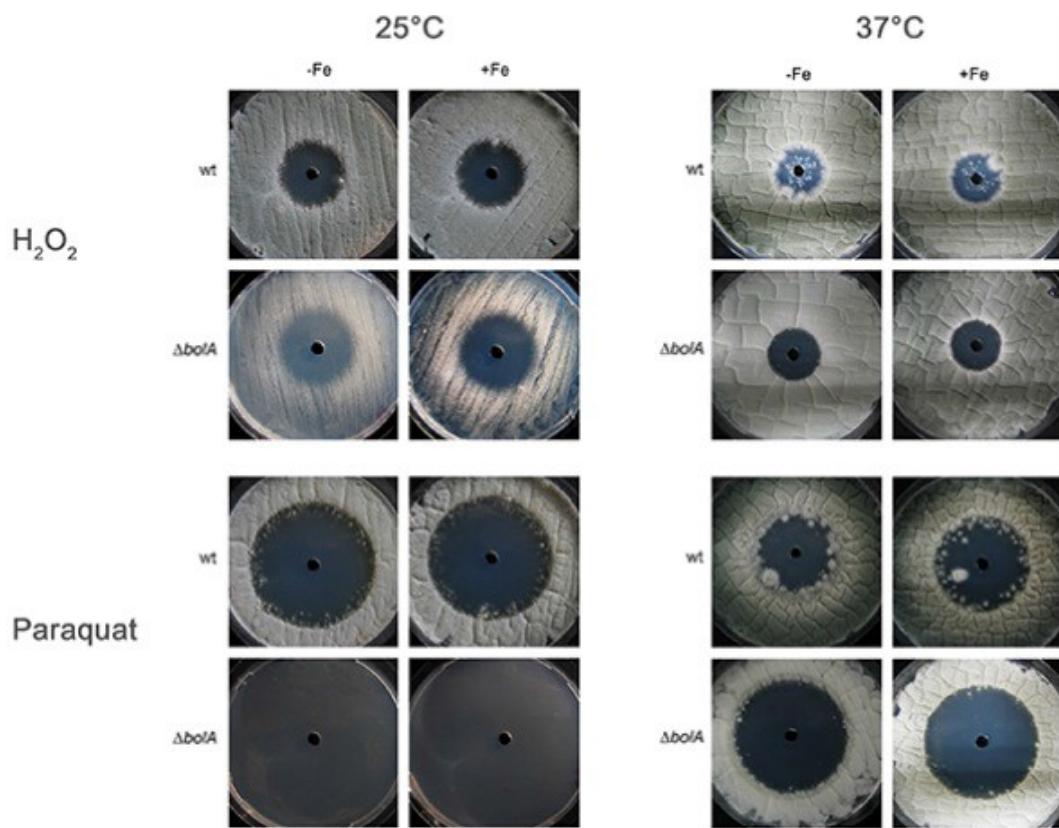


Figure 3. $\Delta bolA$ is more susceptible to ROS inducing agents. Especially paraquat as redox cycler affects the BolA deficient strain.

Subcellular localization of BolA.

BolA like proteins exhibits a helix-loop-helix motif, which is able to bind to DNA, as major structural feature. In order to investigate BolA localization and its putative role of a helix-loop-helix transcription regulator, a *bolA-gfp* fusion construct was generated and introduced in $\Delta bolA$. Homologous integration of a single *bolA-gfp* fusion product was proofed by S-blot analyses (data not shown) and phenotypic characterization (Fig.4C). A transformant carrying the desired integration and reverting the $\Delta bolA$ specific phenotypes was used for immunoblot experiments (Fig.4A). Consistent with previous micro-array experiments BolA was increased under iron limitation (6, 7).

Abschlussberichte

Interestingly we could not observe a nuclear translocation of bolA-gfp regardless of iron availability. However a co-staining with the mitochondria specific dye mitotracker-red validated a mitochondrial localization of bolA-gfp (Fig 4B).

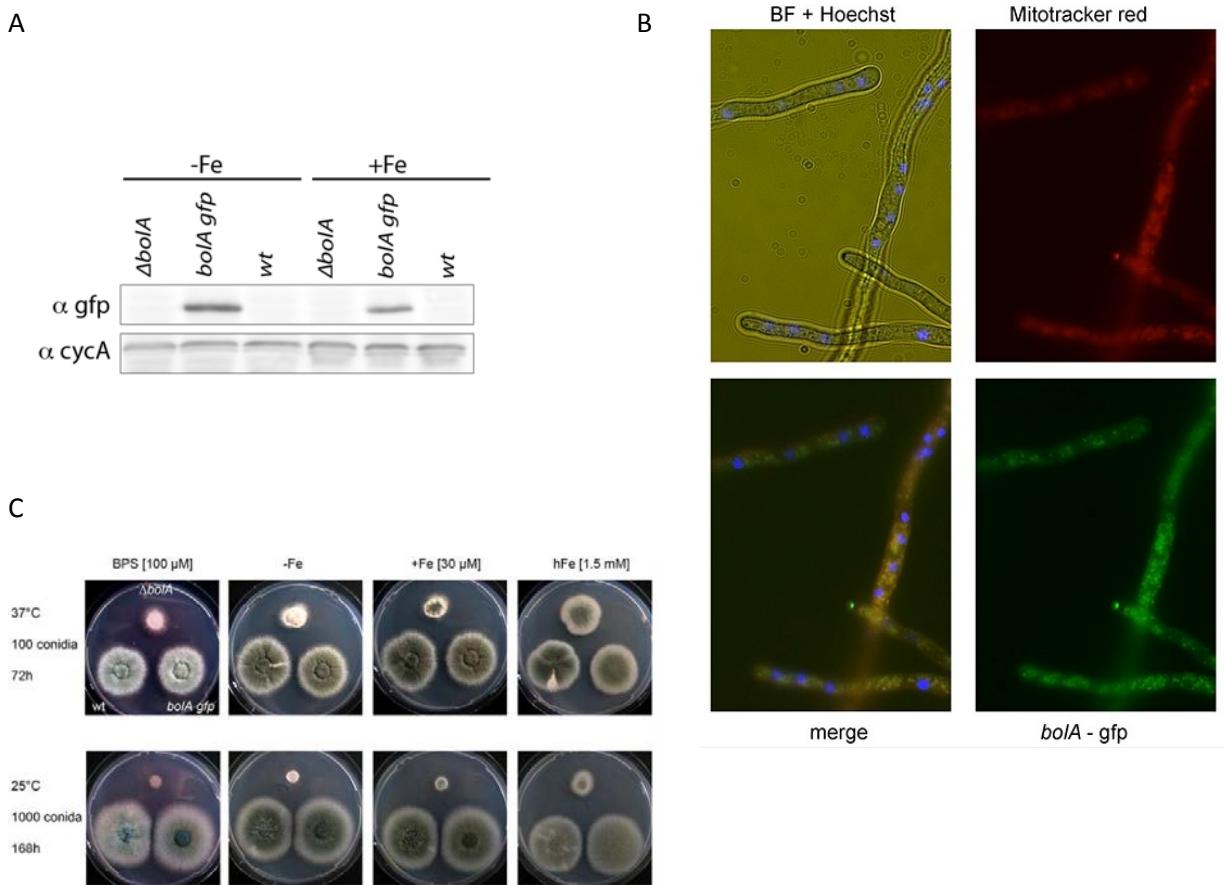


Figure 4. BolA localizes to the mitochondria, but not in the nucleus.

Conclusion:

In this project it was shown, that BolA is required for activation of siderophore biosynthetic genes and stress adaptation of *A. fumigatus*. a function of a BolA domain protein, which has not been characterized in eukaryotes, yet. Unexpectedly BolA was not localized in the nucleus, although it displayed a helix loop helix like structural motif, but mitochondrial localization could be confirmed by GFP-tagging. Due to this unexpected localization, mitochondria of wt, ΔbolA and bolA-gfp were analyzed microscopically, but no phenotypic alterations or mitochondrial morphology could be observed. Additionally mitochondrial DNA content of these strains was quantified by real time PCR under various conditions (temperature, various iron depleted and repleted conditions), but no significant differences could be detected between the strains.

Recent studies in yeast and human link BolA mutations to defects in iron sulfur cluster

assembly (10, 12). Since Δ BolA is hypersensitive to paraquat-induced ROS damage, and mitochondria are the major source of endogenous ROS production, the distinct complexes of the respiratory chain will be blocked with specific inhibitors in order to examine which complexes of the respiratory chain are most affected by BolA deficiency.

Because of these unexpected findings I decided to waive planned RNA sequencing experiments, since alterations in the transcriptome would just explain indirect effects of BolA deficiency. However, with the GFP-tagged version of BolA, it is planned to perform GFP-Trap experiments followed by mass spectroscopy to identify potential BolA interaction partners. This work is already ongoing in cooperation with Prof. Hubertus Haas (Department for Molecular Biology) and Prof. Herbert Lindner (Department for Clinical Biochemistry). Furthermore I started to optimize the isolation mitochondria to specifically investigate effects of BolA deficiency on mitochondrial super-complexes and oxidation status. However isolation of functional mitochondria is a rather effortful task and requires optimization. Still ongoing are analyses of mitochondrial ROS generation. In cooperation with Ulrich Mühlenhoff (Institute for Zytobiology, Philipps-Universität Marburg) enzyme activities of mitochondrial iron sulphur cluster containing enzymes are determined in wt and Δ BolA.

During the funding period of the project I was able to investigate the role of BolA in *A. fumigatus*. Due to the innovative, but to a certain extent unexpected results, the work plan of the project had to be modified and not all objectives could be accomplished.

Several interesting effects could be investigated so far. However, the mechanisms by which BolA impacts on iron homeostasis in *A. fumigatus* could not been resolved, yet, but indicate a central role of mitochondria.

Referenzenliste

1. Tekaia F & Latge JP (2005) Aspergillus fumigatus: saprophyte or pathogen? *Current opinion in microbiology* 8(4):385---392.
2. McDonagh A, et al. (2008) Sub---telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. *PLoS pathogens* 4(9):e1000154.
3. Schrettl M, et al. (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *The Journal of experimental medicine* 200(9):1213---1219.
4. Schrettl M, et al. (2007) Distinct roles for intra--- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS pathogens* 3(9):1195---1207.
5. Chamilos G, et al. (2010) Exploring the concordance of *Aspergillus fumigatus* pathogenicity in mice and Toll---deficient flies. *Medical mycology* 48(3):506---510.
6. Schrettl M, et al. (2010) HapX---mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 6(9):e1001124.
7. Schrettl M, et al. (2008) SreA---mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology* 70(1):27---43.
8. Blatzer M, et al. (2011) SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS genetics* 7(12):e1002374.
9. Kumanovics A, et al. (2008) Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating

[Abschlussberichte](#)

- the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron--- sulfur cluster synthesis. *The Journal of biological chemistry* 283(16):10276---10286.
10. Cameron JM, et al. (2011) Mutations in iron---sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2---oxoacid dehydrogenase enzymes. *American journal of human genetics* 89(4):486---495.
11. Cocheme HM & Murphy MP (2009) Chapter 22 The uptake and interactions of the redox cycler paraquat with mitochondria. *Methods in enzymology* 456:395---417.
12. Li H & Outten CE (2012) Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA---like proteins: [2Fe---2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* 51(22):4377---4389.

[Publikationen mit MUI-START Erwähnung](#)

[Externe Förderung](#)

[Sonstiges](#)

It is planned to include these data in an FWF application as “stand-alone project”.

I thank the Medical University of Innsbruck for providing me the opportunity to perform discrete research on this interesting topic.

Regulation of glycolysis and mitochondrial respiration by BIRC5/Survivin in neuronal tumor cells

DI(FH) Dr. Judith Hagenbuchner
Department für Pädiatrie II

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2012 -31.07.2014

Zusammenfassung

Im Neuroblastom, einer kindlichen Tumorerkrankung findet man häufig eine Überexpression des Proteins Survivin, welche durch eine Zunahme am Chromosom 17q in diesem Tumor verursacht wird. Diese erhöhte Survivin Expression korreliert mit einer ungünstigen Prognose und reduziertem Therapieerfolg. In früheren Arbeiten konnten wir bereits zeigen, dass erhöhtes zelluläres Survivin zur Chemotherapie Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Therapeutika wie Etoposid oder Doxorubicin beiträgt. Beide Chemotherapeutika aktivieren den Transkriptionsfaktor FOXO3 und Apoptose über den intrinsischen Signalweg. Um festzustellen, wie Survivin mitochondrialem Zelltod entgegenwirkt, wurde in dem vorliegenden Projekt die Funktion von Survivin an den Mitochondrien im Detail analysiert. Dabei konnten wir erstmals zeigen, dass Survivin nicht nur zur Chemotherapie Resistenz beiträgt, sondern auch die Struktur und Funktion von Mitochondrien reguliert. Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zellen und spielen auch beim programmierten Zelltod, der Apoptose, eine entscheidende Rolle. Normalerweise sind diese Mitochondrien wie in einem Netzwerk miteinander verbunden – werden einige der Mitochondrien geschädigt, führt dies zum Zusammenbruch des Netzwerkes und zum Zelltod. Die überraschende Entdeckung meiner Arbeit war, dass das Protein Survivin eine Umstrukturierung der Mitochondrien einleitet: das Netzwerk fragmentiert in einzelne, autarke Mitochondrien, die mitochondriale Atmung und der Sauerstoffverbrauch sinken dramatisch ab und die Tumorzellen kompensieren den Energieverlust, indem sie deutlich mehr Glukose verbrauchen und Milchsäure ausscheiden. Damit schützen sich die Krebszellen unter anderem effizient vor Zelltod bei Sauerstoffmangel. Durch diese Umprogrammierung des Energiehaushaltes verhindert Survivin auch die Entstehung von Sauerstoffradikalen und Chemotherapie-induzierten Zelltod. Allerdings „erkaufen“ sich die Krebszellen diese Vorteile mit „Glukose-Abhängigkeit“: Wenn man ihnen diesen Weg der Energiegewinnung blockiert, sterben sie. Ich konnte durch den Einsatz von Glykolyse-Inhibitoren damit auch gleichzeitig einen spezifischen Therapiemechanismus für diese aggressive kindliche Erkrankung identifizieren. Die Ergebnisse dieser durch das MUI-Start Projekt finanzierten Studie wurden 2013 im international renommierten Journal „Oncogene“ publiziert (Hagenbuchner et al, Oncogene 2013) und mit dem Sanofi Preis 2014 prämiert.

Aufbauend auf dieser ersten Arbeit konnte weiters gezeigt werden, dass der Einsatz von Glykolyse-Inhibitoren zu einem spezifischen Abbau von Survivin führt, welcher durch Autophagie mediert wird. Es konnten erstmals die dafür verantwortlichen Ubiquitin-Ligasen identifiziert und auch der spezifische Effekt von Glykolyse-Inhibitoren auf Survivin-überexprimierende Tumore in einem Xenograft Mausmodell bestätigt werden. Diese Ergebnisse werden derzeit in einem Manuscript zusammengefasst und unterstreichen die therapeutische Bedeutung und den potentiellen Einsatz von Glykolyse-Inhibitoren in der Behandlung von Neuroblastotumoren.

Abschlussberichte

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Hagenbuchner, J.; Kuznetsov, A. V.; Obexer, P.; Ausserlechner, M. J. (2013): BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. In: *Oncogene* 32 (40), S. 4748–4757. (IF 8,459)

Hagenbuchner, J.; Kiechl-Kohlendorfer, U.; Obexer, P.; Ausserlechner, M. J. (2015): BIRC5/Survivin as a target for glycolysis inhibition in high-stage neuroblastoma. In: *Oncogene*. In press. (IF 8,459)

Externe Förderung

Sonstiges

Sanofi Preis 2014. Link zur Forschungsarbeit: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.500>

Die Mitbeteiligung des Innenohres beim experimentellen Sepsis-Syndrom mittels Coecum-Ligatur-Punktion Mausmodell

Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Joachim Schmutzhard
Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2011 – 31.07.2014

Zusammenfassung

Das MUI-Startprojekt konzentrierte sich auf die Mitbeteiligung des Innenohres bei experimentellem Sepsis-Syndrom in C57BL/6J Mäusen. Als Goldstandardmodell wurde das CLP-Sepsis Mousemodel (Coecum-Ligatur-Punktion) verwendet.

Das MUI-Startprojekt gliederte sich in 3 einzelne Unterprojekte:

1. Nachweis des Konzepts -
Schwerer Sepsis führt zu einer Mitbeteiligung des Innenohres.
2. Nachweis des Effekt der Sepsis an überlebenden Tieren.
3. Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Sepsis-Parameter auf das Innenohr anhand von Organkulturen.

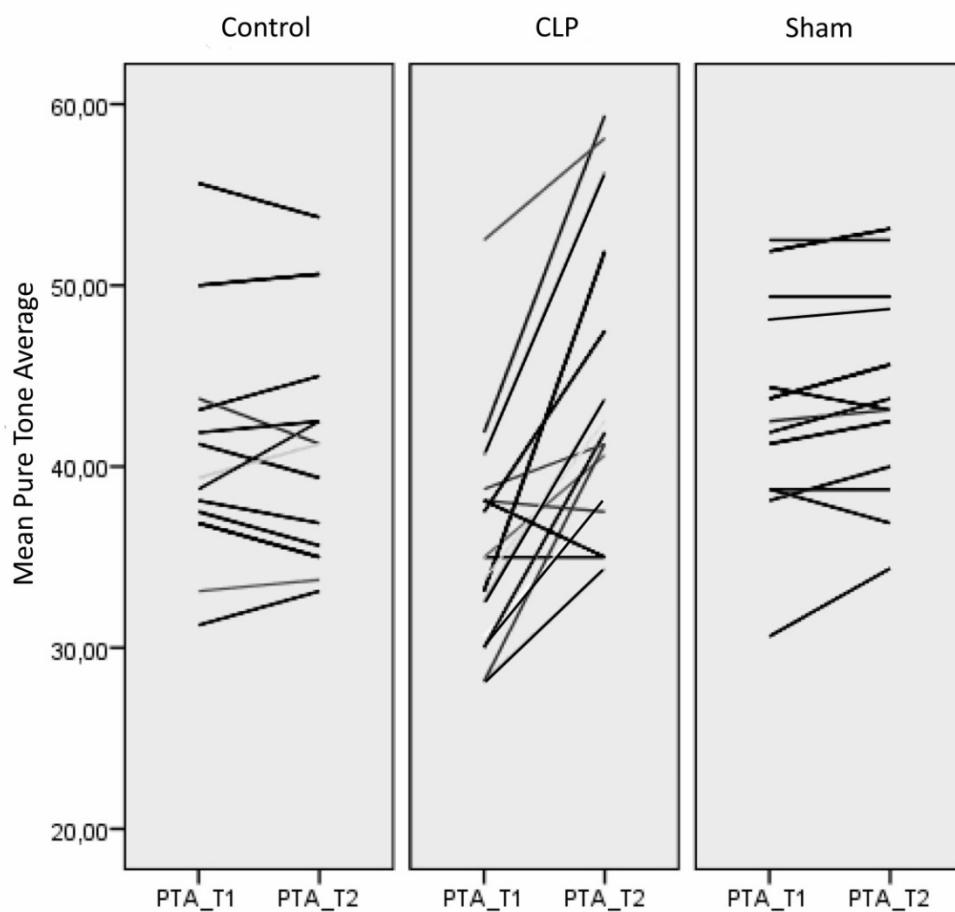
Nachweis des Konzepts - Schwerer Sepsis führt zu einer Mitbeteiligung des Innenohres.

Insgesamt wurden 44 C57 BL/6J Mäuse im Alter von 6-8 Wochen in diesen ersten Teil der Studie inkludiert. Die Sepsis wurde nach den gängigen Methoden mittels Coecum, Ligatur und Punktion eingeleitet. Um eine 100%ige Letalität der Sepsis zu erreichen, wurden drei Viertel des Coecums ligiert sowie eine perforierende Punktion durchgeführt, wie von Rittirsch et al beschrieben (Nat.Protoc. 2009). Die funktionelle Evaluierung des Gehörs wurde mittels auditorisch evozierten Hirnstammpotenzialen vor Inkludierung in die Studie erhoben. Bei regelrechtem Gehör wurden die Tiere in die Studie inkludiert. Die zweite Messung erfolgte bei massiv ausgeprägter präterminaler Sepsis.

Folgende Studiengruppen konnten inkludiert werden:

Zum einen wurden 16 CLP-Mäuse inkludiert, 13 Sham-Tiere (hierbei wurde eine Laparotomie durchgeführt, jedoch keine Ligatur und Punktion) sowie 13 unbehandelte Kontrolltiere.

Die statistische Auswertung mittels Oneway-Kovarianz-Analyse zeigte eine signifikante Hörverschlechterung in der CLP-Sepsis-Gruppe von $P < 0,001$ (Kontrolle vs. CLP). Der statistische Vergleich der Sham-Tiere mit den CLP-Tieren erbrachte einen P -Wert = 0,002. (Abbildung 1)



Schmutzhard et al. DMM 2013

Abbildung 1: Hierbei zeigt sich der Spaghetti-Block der audiologischen Ergebnisse für die Kontroll-Tiere, CLP-Tiere und die Sham-Gruppe. Alle audiologischen Ergebnisse wurden gemittelt und zum Zeitpunkt der Inklusion als PTAT1, zum Zeitpunkt der 2. Messung als PTAT2 dargestellt.

Jede Linie in der Grafik steht für eine individuelle Messung. Es zeigen sich nun in der Kontroll- und der Sham-Gruppe nahezu unveränderte Hörergebnisse im Vergleich der 1. und der 2. Messung. In der CLP-Gruppe zeigt sich jedoch eine deutliche signifikante Hörverschlechterung für sämtliche inkludierte Tiere an.

Morphologische Untersuchungen:

4 Felsenbeine von Tieren mit einem Hörverlust bis 20 dB wurden einer weiteren Untersuchung unterzogen, ebenso 2 Felsenbeine der Sham-Tiere sowie 2 der Kontroll-Tiere.

In der Lichtmikroskopie zeigten sich gut erhaltene Strukturen.

Keine Veränderungen konnten im Spiralganglion sowie in der Stria vascularis und dem Spiralligament gefunden werden. Das cortische Organ zeigte ausgeprägte Vakuolisierungen im Bereich der inneren Haarzellen. Die Deiterschen Zellen zeigten eine intensive Färbung des Zytoplasmas, eine Kromatin-Kondensation sowie eine Kernverkleinerung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigten die pro-apoptotischen Veränderungen der Lichtmikroskopie im cortischen Organ. Es konnte jedoch die basale Vakuolisierung im Bereich der inneren Haarzellen auf die afferenten Nervenfasern zurückverfolgt werden.

Weitere immunhistochemische Untersuchungen für pro-apoptotische Signale wurden mittels Cleaved Caspase 3 Immunhistochemie durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine positive Färbung in den Deiterschen Zellen. (Abbildung 2) Tiere ohne Hörverlust zeigten diese Reaktion nicht.

Fazit:

Zusammenfassend kann von diesem ersten Teil des MUI-Startprojekts resultiert werden, dass eine Sepsis, durch CLP induziert, zu einem signifikanten Hörverlust bei Mäusen führt.

Weiters konnte ein funktionelles Defizit mit der Aktivierung der Apoptose-Kaskade in den Stützzellen des cortischen Organs in Verbindung gebracht werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die basale Vakuolisierung ein typisches Signal von Glutamat-Exzitotoxizität an den radialen Dritten an der Basis der inneren Haarzelle eine Hörverschlechterung resultiert.

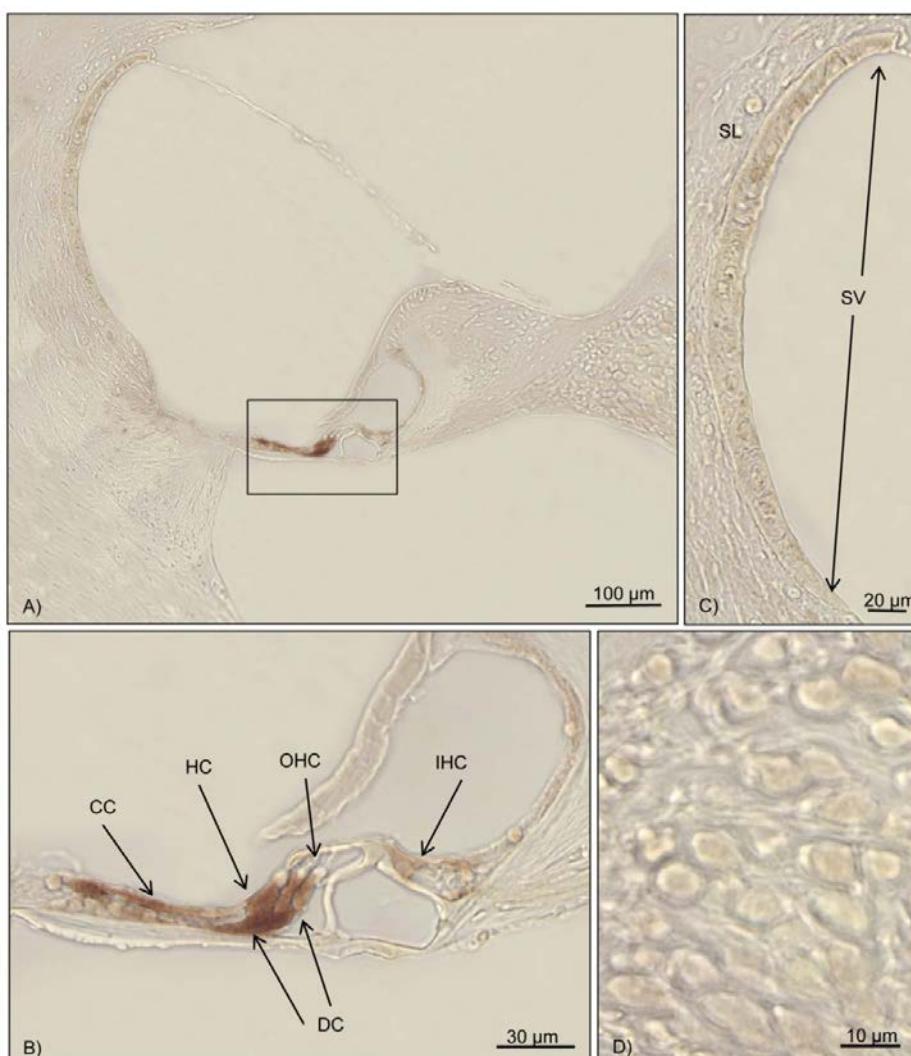


Abbildung 2: Immunhistochemische Untersuchung für Cleaved Caspase 3 in einer hörbeeinträchtigten Cochlea.

Die braune Färbung markiert eine positive Reaktion auf Cleaved Caspase 3.

In A) zeigt sich ein Überblick über den Ductus cochlearis im mittleren Bereich der Cochlea. Das Rechteck zeigt das cortische Organ. B) Die höhere Vergrößerung des cortischen Organs zeigt eine ausgeprägte intensive immunhistochemische Färbung in den Stützzellen des cortischen Organs (Deitersche Zellen, Hensensche Zellen und Claudius Zellen). Keine weitere Färbung kann in den inneren und äußeren Haarzellen dargestellt werden. C) große Vergrößerung der Stria vascularis, ebenfalls zeigen sich keine Veränderungen. D) Vergrößerung des Spiralganglions OHC – äußere Haarzelle, IHC – innere Haarzelle, CC – Claudiuszelle, DC – Deitersche Zelle, HC – Hensensche Zelle, SL – Spiralligament SV – Stria vascularis

Nachweis des Effekts der Sepsis an überlebenden Tieren.

Die 2. Studie im Rahmen des MUI-Startprojekts sollte den Nachweis liefern, dass auch bei Tieren, die nicht präterminal sind sondern die Sepsis überleben, ein Effekt auf das Innenohr resultiert.

Hierfür wurden 50 Tiere in die Studie inkludiert. Der Studienaufbau zeigte sich ident zum Konzept der Vorgängerstudie. Lediglich wurde bei der Induktion der Sepsis ein weniger schwerer Krankheitsverlauf angestrebt. Eine Eigenart des CLP-Sepsis-Modells ist es, bei Ligatur eines kleineren Teiles des mäuslichen Coecums auch geringere Letalitätsraten zu erreichen. In der Literatur wurde beschrieben, bei einer Ligatur von nur 50% des Coecums sollte eine 40%ige Überlebensrate der Sepsis erreicht werden.

Die Ergebnisse wurden in dieser Unterstudie, ebenfalls wie in der zuvor beschriebenen Vorstudie, mittels Oneway-Kovarianz-Analyse durchgeführt. Des Weiteren wurden zur statistischen Evaluierung sämtliche gemessenen Hörergebnisse individuell gemittelt.

Von den 50 inkludierten Tieren dienten 15 Tiere als Sham-Tiere sowie 35 Tiere als CLP-Tiere. Von den 35 CLP-Tieren überlebten 40%. Von den Sham-Tieren konnten 12 individuelle Tiere einer endgültigen Untersuchung unterzogen werden. Des Weiteren wurden 13 Kontroll-Tiere inkludiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es auch bei Sepsis überlebenden Tieren zu einer signifikanten Hörverschlechterung kommt.

Die statistische Auswertung mittels Oneway-Kovarianz-Analyse konnte zeigen, dass Tiere mit CLP-Sepsis ein signifikant schlechteres Hören haben (CLP vs. Kontroll P< als 0,001/CLP vs. Sham P< als 0,001). (Abbildung 3)

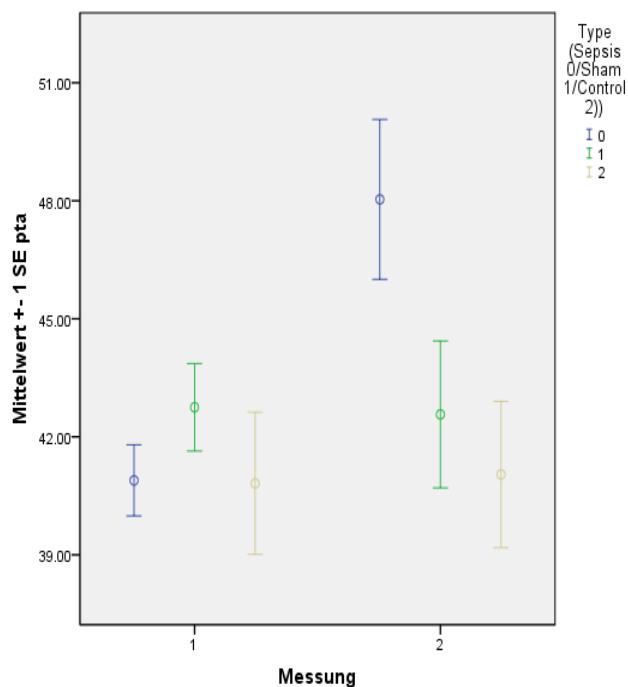


Abbildung 3:

zeigt die gemittelten Hörschwellen für die unterschiedlichen Studiengruppen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das durchschnittliche Hören bei ca. 42 dB bei gesunden Tieren liegt. Nach Induktion der Sepsis zeigte sich in der Sepsis-Gruppe ein durchschnittlicher Anstieg der Hörleistung auf 48 dB, während die Hörleistungen der Sham-Tiere und Kontroll-Tiere ident blieben.

Morphologische Untersuchungen:

Die Felsenbeine von Tieren mit einem hohen Hörverlust sowie der Sham-Tiere und der Kontroll-Tiere wurden abermals einer lichtmikroskopischen sowie immunhistochemischen Untersuchung für Apoptose mit einbezogen. Die lichtmikroskopischen Ergebnisse unterschieden sich von den zuvor beschriebenen Ergebnissen nicht. Auch die Untersuchungen für pro-apoptotische Signalmarker Cleaved Caspase 3

zeigten nun ein positives Signal im Bereich der Stützzellen, vor allem den Deiterschen, Hensenschen und den Claudius Zellen. Des Weiteren konnte eine Induktion von Apoptose im Bereich der Spiralganglienzellen dargestellt werden.

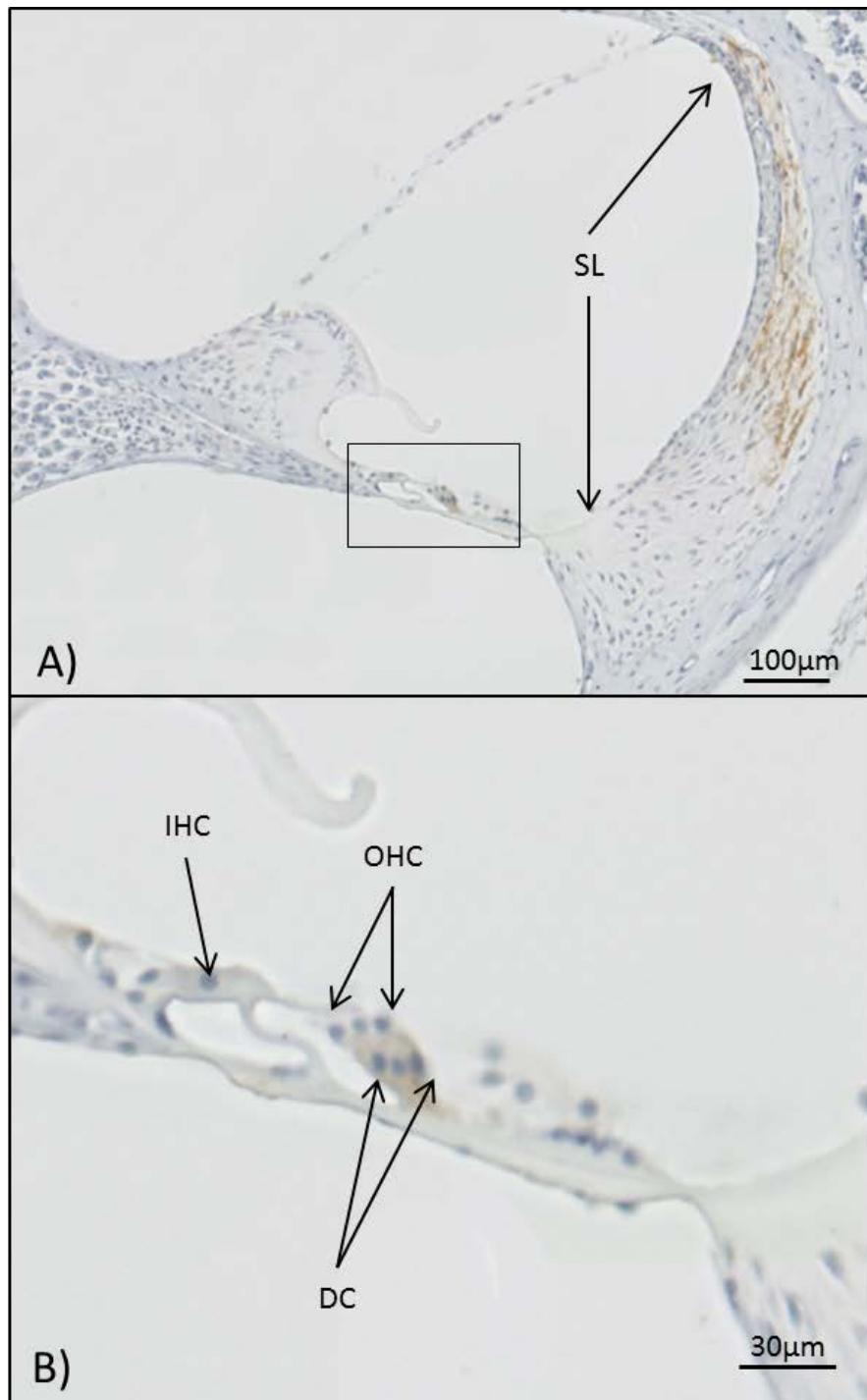


Abbildung 4: A) zeigt einen Querschnitt durch den Ductus Cochlearis. Die Braunfärbung signalisiert eine positive Reaktion auf Cleaved Caspase 3, einem immunohistochemischen Marker für Apoptose. Auffallend ist die positive Reaktion im Spiralligament (SL – Spiralligament) und im cortischen Organ (Rechteck). B) gibt eine Vergrößerung des cortischen Organs wieder. Apoptose positiv zeigen sich hierbei vor allem die Deiterschen Zellen. DC Deiter Zellen, OHC – äußere Haarzelle, IHC – innere Haarzelle.

Fazit:

Der 2. Teil der Studie zeigt, dass Sepsis auch bei Tieren, die das Krankheitsbild überleben, zu einer signifikanten Hörverschlechterung im Innenohr führt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ebenfalls eine Induktion von Apoptose im Bereich des cortischen Organs beobachtet werden kann.

Zusätzlich wurde auch eine Aktivierung der apoptotischen Kaskade im Bereich des Spiralligaments nachgewiesen werden kann. Die Apoptose im Spiralligament lässt Rückschlüsse auf eine Störung der Blutlabyrinthschranke und damit auf eine Störung der Kalium- Rezirkulation ziehen.

Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Sepsis-Parameter auf das Innenohr anhand von Organkulturen.

Als 3. Teil des MUI-Startprojekts wurden Organkulturen der Cochlea angelegt. Mittels speziellen Rotationskultursystemen ist es möglich, gesamte Innenohren für 24 Stunden und mehr in Kultur zu halten. Diese Organkulturen ermöglichen es nun, unterschiedliche Parameter auf ihre Innenohrschädlichkeit zu prüfen.

Im Rahmen des Sepsis-Projekts und der klinischen Evaluierung konnte gezeigt werden, dass kranke Tiere an einer Hypothermie unter 32° leiden. Des Weiteren konnte eine positive Blutkultur für E-coli nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Blutuntersuchungen, dass es zu einer Lactatazidose in den Tieren kam.

Der Ansatz dieses Kulturmodells bestand darin zu untersuchen, inwieweit sich diese klinischen Parameter auf die Funktionalität des Innenohres auswirken und inwieweit sie mit Apoptose-Induktion in Verbindung zu bringen sind. Die vier Studiengruppen haben sich wie folgt unterteilt: 1) Kontrolle – Kultur ohne Zusatz. 2) Hypothermie – die Kultur wurde bei 34° Celsius angelegt. 3) E. Coli Lysat – die Kultur wurde mit einer E. Coli Lysat inkubiert. 4) Lactatazidose – die Kultur wurde bei pH 7.0 und mit 40 mg/dl Lactat angelegt.

Es konnte nun an jeweils 3 Cochleae pro Gruppe gezeigt werden, dass die Kontrollen nicht zu einer Induktion von Apoptose führen. Ident verhielt sich die E.Coli gruppe. Des Weiteren zeigte sich auch ein oto-protectiver Effekt von Hypothermie mit deutlich besser erkennbaren Strukturen und geringerer Apoptose-Induktion. In der Lactatazidosegruppe zeigte sich eine intensive Cleaved Caspase 3 Reaktion sowie Auflösung des cortischen Organs.

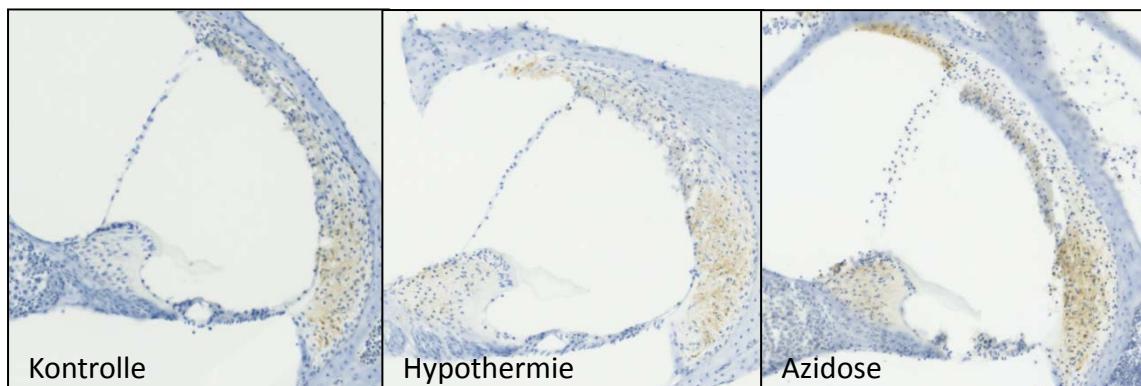


Abbildung 5: Hier zeigen sich nun die lichtmikroskopischen Ergebnisse der Kontrollgruppe, der Hypothermie-Gruppe sowie der Lactatazidose-Gruppe. Es zeigt sich ein guter Strukterhalt im Rahmen der **Kontrollgruppe**, eine geringe Apoptose-Induktion kann erwartet werden. **Hypothermie**: ebenfalls zeigt sich hier eine Apoptose-Induktion im Bereich des Spiralligaments. **Lactatazidose-Gruppe**: hierbei zeigen sich eine Desintegration des cortischen Organs sowie ein ausgeprägtes, nahezu in Auflösung befindliches Spiralligament mit intensiver Apoptose-Induktion.

Untersuchungen der Integrität des cortischen Organs mittels Phalloidin - einem Zytoskelettmarker, der als ein verlässlicher Marker für den Nachweis eines intakten cortischen Organs etabliert ist – zeigten hohe Signalintensitäten in der Kontrollgruppe sowie der Hypothermiegruppe. Kein Signal konnte in der Lactosegruppe nachgewiesen werden. Neuronale Strukturen im cortischen Organ wurden mittels Beta III Mikrotubulin untersucht. Erhaltene neuronale Strukturen waren in der Kontrollgruppe und Hypothermiegruppe, nachweisbar. Die E.Coli- Gruppe zeigte identische Ergebnisse wie die Kontrollgruppe.



Abbildung 6:

Hier zeigen sich fluoreszenzmikroskopische Bilder vom cortischen Organ für die Kontrollgruppe, Hypothermie-Gruppe und Lactatazidose-Gruppe. Es zeigen sich in der **Kontrollgruppe** adäquat erhaltene Zellkerne sowie ein adäquates Zytoskelett in grün (rot zeigt sich Beta-III-Tubulin als neuronaler Marker, der ebenfalls eine intakte Innervierung des cortischen Organs anzeigt). **Hypothermie-Gruppe:** der otoprotektive Effekt zeigt sich in dieser Darstellung bei deutlich intensiverer Darstellung des grünen Zytoskeletts sowie der roten Nervenfasern. Die **Lactatazidose-Gruppe** zeigt im cortischen Organ, entsprechend dem lichtmikroskopischen Bild, eine destruktive Gesamtsituation.

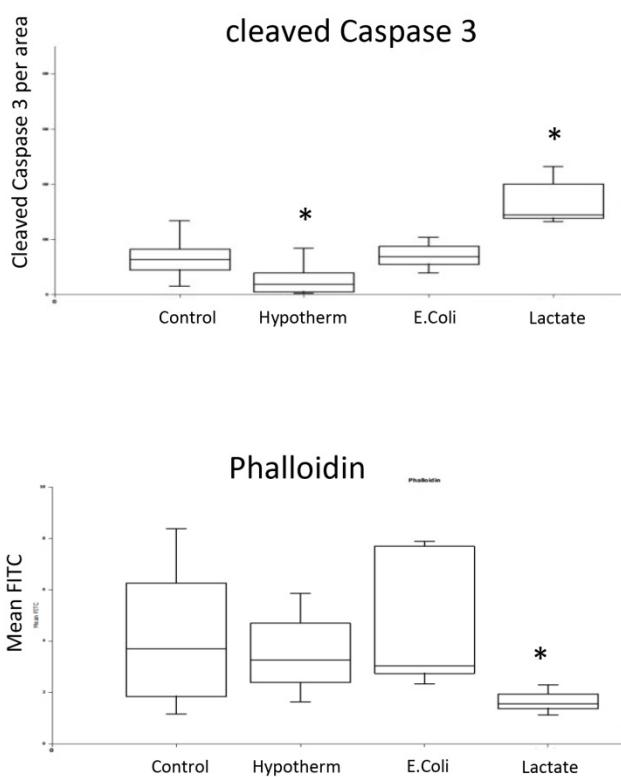


Abbildung 7:

Es zeigen sich nun nach quantitativer Auswertung für Cleaved Caspase 3 und Phalloidin folgende Ergebnisse:

Cleaved Caspase 3: hierbei zeigt sich eine deutlich geringere Intensität für Cleaved Caspase 3 in der Hypothermie-Gruppe sowie signifikant höhere Ergebnisse in der Lactatazidose-Gruppe.

Phalloidin-Ergebnisse: ein hoher Phalloidinwert korreliert mit gutem Strukterhalt. So können nun in Kontroll-, hypothermie- und E-coli-Gruppe regelrechte Phalloidinwerte dargestellt werden. Deutliche Verringerungen zeigen sich in der Lactatazidose-Gruppe.

Abschlussberichte

Abschließend zeigt dieser experimentelle Ansatz, dass eine Hypothermie, die auch im Mousemodel vorhanden ist, einen gewissen otoprotektiven Effekt hat. Als hauptsächlich pathogene Ursache zeigte sich die Lactatazidose, die in den Sepsis-Tieren beobachtet werden konnte.

Fazit für das MUI-Startprojekt von Joachim Schmutzhard

Im Rahmen dieses experimentellen Projektes konnte gezeigt werden, dass Sepsis zu einer signifikanten Hörverschlechterung bei Mäusen führt. Dies lässt sich aufgrund von Apoptose in den Stützzellen, als auch aufgrund von Glutamat-Exzitotoxizität an der Basis der inneren Haarzellen zurückführen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Veränderungen auch bei Sepsis überlebenden Tieren relevant sind.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei längerem Einwirken der Sepsis auch eine Apoptose im Bereich des Spiralligaments nachzu vollziehen ist.

Die Organkulturen konnten die in der Sepsis vorhandene Azidose als innenohrpathologische Ursache identifizieren.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Schmutzhard, Joachim; Glueckert, Rudolf; Pritz, Christian; Blumer, Michael J F; Bitsche, Mario; Lackner, Peter et al. (2013): Sepsis otopathy: experimental sepsis leads to significant hearing impairment due to apoptosis and glutamate excitotoxicity in murine cochlea. In: *Disease models & mechanisms* 6 (3), S. 745–754. (IF 4.973)

Externe Förderung

Sonstiges

Kongressbeiträge

Vorträge:

IFOS 2013 Sepsisotopathie proof of concept

ÖHNO 2013 Sepsisotopathie

ÖHNO 2014 In Vito Evaluation des Effekts von klinischen Sepsis-Parametern an der adulten murinen Cochlea

MUI START Symposium 2014 Sepsis otopathy proof of concept

Poster:

ARO 2014 In vitro evaluation of the effects of clinical sepsis parameters on the murine cochlea.

Außerdem konnten durch die Finanzierung von MUI-Start folgende Diplomarbeiten an der Medizinischen Universität Innsbruck angeregt und abgeschlossen werden:

- **Mathias Haarkamp:** Nachweis einer Innenohrschwerhörigkeit durch ABR-Messung am Sepsis-Mousemodel
- **Simon Zaar:** Effekt klinischer Sepsis-Parameter auf das Innenohr der adulten Maus in einem Cochlea-Kulturmodell
- **Julian Weser:** Die Anwendbarkeit des Shirpa-Scores auf die CLP-Maus
- **Nina Matonia:** Nachweis der Innenohrbeteiligung bei der überlebenden CLP-Maus
- **Georges Höllerich:** Immunhistochemische Untersuchung der Sepsis geschädigten Cochlea

Targeted immunomodulation by use of biologics to minimize/avoid maintenance immunosuppression in vascularized composite tissue allografts

Robert Sucher, MD

Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie

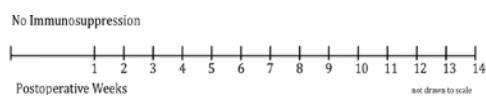
3 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2012 - 31.07.2014

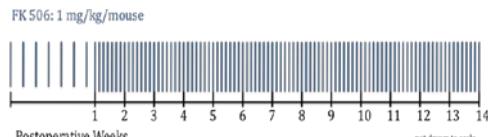
Zusammenfassung

The following experimental plan was tested in a full MHC mismatched mouse hind limb VCA model where recipients received a vascularized hind limb transplant. Immunosuppression so far combined standard treatment comprising tacrolimus, CTLA4-Ig and DST. Untreated mice transplanted with hind limb allografts served as controls.

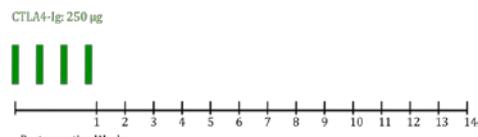
Group 1: no treatment



Group 2: Tacrolimus (FK506)



Group 3: CTLA4-Ig (short)



Group 4: DST



Preliminary results indicate that, as expected, untreated controls rejected their allograft within 6 days after transplant. Continuous Tacrolimus treatment resulted in long term graft survival 100% in all treated subjects. DST and CTLA4-Ig treatment led to prolonged allograft survival (mean: 12 vs 27 days), however both treatment protocols were insufficient to induce long term graft survival. These data have been confirmed by H&E histology for all separate components of the VCA including skin, muscle, nerve and blood vessels. Future experiments comprising project groups 5 to 9 will provide further insights into the complex immunological setting of VCA allografts.

So far the entire amount of funding has been spent. Once remaining groups were transplanted and analyzed a manuscript will be prepared and submitted to a peer-reviewed journal within the field of transplantation. The Department of Visceral, Transplant and Thoracic Surgery from Innsbruck Medical University will be denominated as the leading affiliation. No further funding is required for a successful conclusion of this project.

Externe Förderung

- Projektabschlussberichte der 4. Antragsperiode

Der Abschlussbericht von Herrn Dr. Sebastian Herzog (Regulation of B cell development by long non-coding RNAs) liegt dem Servicecenter Forschung vor. Aufgrund der Aktualität der Ergebnisse und des Umstandes, dass diese noch nicht publiziert wurden, ist dieser Abschlussbericht nicht veröffentlicht worden.

James Wood Ph. D.

Institut für Pharmakologie

4 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2013 - 31.10.2014

Zusammenfassung

Theme: The main focus of the project was to determine how dopamine modulates inhibitory neurotransmission in a brain circuit involved in the pathophysiology of anxiety disorders. A deeper understanding of how dopamine influences circuits involved in fear and anxiety may lead to new treatment options.

All experiments were conducted in the Department of Pharmacology, Medical University Innsbruck.

Summary of results

Anxiety disorders and post-traumatic stress disorder (PTSD) are thought to arise from maladaptive alterations in brain circuits involved in fear and survival responses. In particular, impairments in extinguishing aversive memories are believed to contribute to anxiety disorders and PTSD. Synaptic plasticity in a circuit involving the basolateral amygdala (BLA), main intercalated nucleus (Im), and medial subdivision of the central amygdala (CEm) has a central role in fear extinction. Specifically, feedforward inhibition between the BLA and CEm, via GABAergic neurons of the Im, is enhanced after fear extinction. Dopaminergic inputs to the amygdala provide essential cues for processing affective stimuli; however how dopamine modulates the BLA-Im-CEm circuit is unclear.

Using an electrophysiological technique, specifically whole-cell patch clamp, we studied feedforward inhibition between the BLA and CEm in the absence and presence of dopamine. By recording inhibitory postsynaptic potentials in CEm neurons in response to electrical stimulation of the BLA, we found that dopamine rapidly and reversibly suppressed inhibition of the CEm, an effect that was not blocked by the dopamine D1 receptor antagonist, SCH 23390.

Our results demonstrate that dopamine suppresses feed forward inhibition between the BLA and CEm, a circuit critically involved in fear extinction. We were however unable to identify the receptor(s) involved - an issue that will be resolved during the continuation of this project in the framework of a FWF Lise Meitner Fellowship.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Externe Förderung

FWF Lise Meitner Grant M 1783 (€ 157.380,00) „Dopamine and NPY signaling in a fear extinction circuit”. PI James Wood

Circulating fetuin-A and arterial stiffness after acute ST-segment elevation myocardial infarction.

Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. Gert Klug

Universitätsklinik für Innere Medizin III, Kardiologie und Angiologie

4 Antragsperiode

Berichts-/Förderzeitraum: 01.08.2013 – 31.03.2015

Zusammenfassung

Zielsetzung: Ziel des Projektes war es, an Patienten nach akutem ST-Hebungsinfarkt die Rolle von Fetuin-A, einem Glykoprotein mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, zu untersuchen.

Methoden: An 135 Patienten mit akutem ST-Hebungsinfarkt wurden Plasmaproben gesammelt und mittels ELISA Kits die Fetuin-A Spiegel innerhalb der ersten Woche nach Ereignis bestimmt. An allen Patienten wurden die Infarktcharakteristika sowie die aortale Pulswellengeschwindigkeit, als Maß für die Atheroskleroselast, mittels kardialer Magnetresonanztomografie bestimmt.

Ergebnisse: Im Zeitraum der beantragten Studie konnten folgende Ergebnisse gewonnen und publiziert werden:

- Die Pulswellengeschwindigkeit gemessen mittels MRT korreliert gut mit alternativen, zum Beispiel oszillometrischen, Methoden zur Messung der aortalen Elastizität (Feistritzer HJ, PlosONE 2014).
- Die aortale Pulswellengeschwindigkeit bei Infarktpatienten prädiziert die Spiegel von Markern für myokardialen Stress (NT-proBNP). Dies weist auf eine Rolle der aortalen Elastizität im chronischen Prozess nach Herzinfarkt hin (Klug G, Int J Card 2014). Diese Ergebnisse wurden im Follow-up bestätigt (Feistritzer HJ, J Hypertens 2015).
- Die Spiegel von Fetuin-A im akuten Stadium erlauben eine Abschätzung der akuten und chronischen (4 Monate) Infarktgröße, Linksventrikelfunktion und Linksventrikeldiameter. Eine Korrelation mit der aortalen Pulswellengeschwindigkeit konnte nicht nachgewiesen werden (Feistritzer HJ, Open Heart 2015).
- Alternative Marker für die Funktion und Morphologie des linksventrikulären Myokards wie zum Beispiel der LVGFI (left ventricular global function index) scheinen im akuten Stadium keinen zusätzlichen prognostischen Wert gegenüber der standardmäßig verwendeten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) zu besitzen (Reinstadler SJ, Eur H J Cardiovasc Img 2015).

Eine Reihe weiterer Arbeiten konnten in der Förderungsperiode fertiggestellt werden:

1. Reinstadler SJ, Feistritzer HJ, **Klug G**, Mayr A, Huybrechts L, Hammerer-Lercher A, Mair J, Franz WM, Metzler B (2015): Biomarkers of hemodynamic stress and aortic stiffness after STEMI: a cross-sectional analysis. Dis Markers. 2015;2015:717032.
2. Feistritzer HJ, Reinstadler SJ, **Klug G**, Kremser C, Seidner B, Esterhammer R, Schocke MF, Franz WM, Metzler B (2015): Comparison of an oscillometric method with cardiac magnetic resonance for the analysis of aortic pulse wave velocity. PLoS One. 22;10(1):e0116862.

Abschlussberichte

3. **Klug G**, Feistritzer HJ, Reinstadler SJ, Mayr A, Kremser C, Schocke M, Franz WM, Metzler B (2014): Use and limitations of Cardiac Magnetic Resonance derived measures of aortic stiffness in patients after acute myocardial infarction; *Magn Reson Imaging* 32:1259-65.
4. van Kranenburg M, Magro M, Thiele H, de Waha S, Eitel I, Cochet A, Cottin Y, Atar D, Buser P, Wu E, Lee D, Bodi V, **Klug G**, Metzler B, Delewi R, Bernhardt P, Rottbauer W, Boersma E, Zijlstra F, van Geuns RJ (2014): Prognostic Value of Microvascular Obstruction and Infarct Size, as Measured by CMR in STEMI Patients. *JACC Cardiovasc Imaging* 7:930-939.
5. Esterhammer R, **Klug G**, Wolf W, Mayr A, Holotta M, Metzler B, Schocke MF (2014): Cardiac High-Energy Phosphate Metabolism alters with Age as studied in 196 healthy males with the
6. **Klug G**, Reinstadler SJ, Feistritzer HJ, Müller S, Jaschke W, Metzler B (2015): A solid mass trapped in the right atrium. *Eur Heart J ehv361*. [Epub ahead of print].
7. Reinstadler SJ, Klug G, Feistritzer HJ, Metzler B, Mair J (2015). Copeptin testing in acute myocardial infarction: ready for routine use? *Dis Markers* 2015:614145.

Die Bedeutung von Fetuin-A in der prognostischen Abschätzung nach Herzinfarkt konnte durch unsere geförderten Arbeiten erstmals gezeigt werden.

Publikationen mit MUI-START Erwähnung

Feistritzer, Hans-Josef; Klug, Gert; Reinstadler, Sebastian J.; Gröber, Marie-Therese; Mair, Johannes; Kirchmair, Rudolf et al. (2015): Fetuin-A is related to infarct size, left ventricular function and remodelling after acute STEMI. In: *Open heart* 2 (1), S. e000244. (IF N/A)

Feistritzer, Hans-Josef; Klug, Gert; Reinstadler, Sebastian J.; Mair, Johannes; Seidner, Benjamin; Mayr, Agnes et al. (2015): Aortic stiffness is associated with elevated high-sensitivity cardiac troponin T concentrations at a chronic stage after ST-segment elevation myocardial infarction. In: *Journal of hypertension* 33 (9), S. 1970–1976. (IF 4,720)

Feistritzer, Hans-Josef; Reinstadler, Sebastian J.; Klug, Gert; Kremser, Christian; Seidner, Benjamin; Esterhammer, Regina et al. (2015): Comparison of an oscillometric method with cardiac magnetic resonance for the analysis of aortic pulse wave velocity. In: *PLoS one* 10 (1), S. e0116862. (IF 3,234)

Reinstadler, Sebastian J.; Klug, Gert; Feistritzer, Hans-Josef; Kofler, Markus; Pernter, Bastian; Göbel, Georg et al. (2015): Prognostic value of left ventricular global function index in patients after ST-segment elevation myocardial infarction. In: *European heart journal cardiovascular Imaging*. In Press. (IF 4,124)

Klug, G.; Feistritzer, H. J.; Reinstadler, S. J.; Krauter, L.; Mayr, A.; Mair, J. et al. (2014): Association of aortic stiffness with biomarkers of myocardial wall stress after myocardial infarction. In: *International journal of cardiology* 173 (2), S. 253–258. (IF 4,036)

Externe Förderung

Sonstiges

Forschungsstipendium der Österreichischen Gesellschaft für Kardiologie 2014 für einen Mitarbeiter der AG (Dr. Feistritzer) für das Projekt: „Prognostic value of left ventricular global function index in patients after ST-segment elevation myocardial infarction“

„Werner-Klein Forschungspreis 2015“ für Dr. Klug für die geförderte Arbeit: „Association of aortic stiffness with biomarkers of myocardial wall stress after myocardial infarction“.

6. LITERATURVERZEICHNIS (Publikationen der abgeschlossenen MUI-START Projekte mit MUI-START Erwähnung)

Binder, Ulrike; Maurer, Elisabeth; Lass-Flörl, Cornelia (2015): *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. In: *Fungal Biology*. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.06.002.

Feistritzer, Hans-Josef; Klug, Gert; Reinstadler, Sebastian J.; Gröber, Marie-Therese; Mair, Johannes; Kirchmair, Rudolf et al. (2015): Fetuin-A is related to infarct size, left ventricular function and remodelling after acute STEMI. In: *Open heart* 2 (1), S. e000244. DOI: 10.1136/openhrt-2015-000244.

Feistritzer, Hans-Josef; Klug, Gert; Reinstadler, Sebastian J.; Mair, Johannes; Seidner, Benjamin; Mayr, Agnes et al. (2015): Aortic stiffness is associated with elevated high-sensitivity cardiac troponin T concentrations at a chronic stage after ST-segment elevation myocardial infarction. In: *Journal of hypertension* 33 (9), S. 1970–1976. DOI: 10.1097/HJH.0000000000000644.

Feistritzer, Hans-Josef; Reinstadler, Sebastian J.; Klug, Gert; Kremser, Christian; Seidner, Benjamin; Esterhammer, Regina et al. (2015): Comparison of an oscillometric method with cardiac magnetic resonance for the analysis of aortic pulse wave velocity. In: *PLoS one* 10 (1), S. e0116862. DOI: 10.1371/journal.pone.0116862.

Fischer, Marlene; Dietmann, Anelia; Beer, Ronny; Broessner, Gregor; Helbok, Raimund; Pfausler, Bettina et al. (2013): Differential regulation of matrix-metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. In: *PLoS one* 8 (3), S. e59952. DOI: 10.1371/journal.pone.0059952.

Frauscher, Birgit; Gabelia, David; Mitterling, Thomas; Biermayr, Marlene; Bregler, Deborah; Ehrmann, Laura et al. (2014): Motor events during healthy sleep: a quantitative polysomnographic study. In: *Sleep* 37 (4), S. 763-73, 773A-773B. DOI: 10.5665/sleep.3586.

Frauscher, Birgit; Mitterling, Thomas; Bode, Aleke; Ehrmann, Laura; Gabelia, David; Biermayr, Marlene et al. (2014): A prospective questionnaire study in 100 healthy sleepers: non-bothersome forms of recognizable sleep disorders are still present. In: *Journal of clinical sleep medicine : JCSM : official publication of the American Academy of Sleep Medicine* 10 (6), S. 623–629. DOI: 10.5664/jcsm.3784.

Gabelia, David; Mitterling, Thomas; Högl, Birgit; Wenning, Gregor K.; Frauscher, Birgit (2014): Do periodic arm movements during sleep exist in healthy subjects? A polysomnographic study. In: *Sleep medicine* 15 (9), S. 1150–1154. DOI: 10.1016/j.sleep.2014.05.014.

Gründlinger, Mario; Gsaller, Fabio; Schreitl, Markus; Lindner, Herbert; Haas, Hubertus (2013): *Aspergillus fumigatus* SidJ mediates intracellular siderophore hydrolysis. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (23), S. 7534–7536. DOI: 10.1128/AEM.01285-13.

Hagenbuchner, J.; Kiechl-Kohlendorfer, U.; Obexer, P.; Ausserlechner, M. J. (2015): BIRC5/Survivin as a target for glycolysis inhibition in high-stage neuroblastoma. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2015.264.

Hagenbuchner, J.; Kuznetsov, A. V.; Obexer, P.; Ausserlechner, M. J. (2013): BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. In: *Oncogene* 32 (40), S. 4748–4757. DOI: 10.1038/onc.2012.500.

Hoefer, Julia; Kern, Johann; Ofer, Philipp; Eder, Iris E.; Schäfer, Georg; Dietrich, Dimo et al. (2014): SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. In: *Endocrine-related cancer* 21 (2), S. 175–187. DOI: 10.1530/ERC-13-0446.

- Klug, G.; Feistritzer, H. J.; Reinstadler, S. J.; Krauter, L.; Mayr, A.; Mair, J. et al. (2014): Association of aortic stiffness with biomarkers of myocardial wall stress after myocardial infarction. In: *International journal of cardiology* 173 (2), S. 253–258. DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.02.038.
- Koch, Miriam; Clementi, Nina; Rusca, Nicola; Vögele, Paul; Erlacher, Matthias; Polacek, Norbert (2015): The integrity of the G2421-C2395 base pair in the ribosomal E-site is crucial for protein synthesis. In: *RNA biology* 12 (1), S. 70–81. DOI: 10.1080/15476286.2015.1017218.
- Manzl, C.; Fava, L. L.; Krumschnabel, G.; Peintner, L.; Tanzer, M. C.; Soratno, C. et al. (2013): Death of p53-defective cells triggered by forced mitotic entry in the presence of DNA damage is not uniquely dependent on Caspase-2 or the PIDDosome. In: *Cell Death Dis* 4 (12), S. e942. DOI: 10.1038/cddis.2013.470.
- Manzl, Claudia; Baumgartner, Florian; Peintner, Lukas; Schuler, Fabian; Villunger, Andreas (2013): Possible pitfalls investigating cell death responses in genetically engineered mouse models and derived cell lines. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 61 (2), S. 130–137. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.02.012.
- Massoner, P.; Thomm, T.; Mack, B.; Untergasser, G.; Martowicz, A.; Bobowski, K. et al. (2014): EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. In: *British journal of cancer* 111 (5), S. 955–964. DOI: 10.1038/bjc.2014.366.
- Maurer, Elisabeth; Browne, Niall; Surlis, Carla; Jukic, Emin; Moser, Patrizia; Kavanagh, Kevin et al. (2015): Galleria mellonella as a host model to study Aspergillus terreus virulence and amphotericin B resistance. In: *Virulence*, S. 1–8. DOI: 10.1080/21505594.2015.1045183.
- Nairz, Manfred; Schroll, Andrea; Demetz, Egon; Tancevski, Ivan; Theurl, Igor; Weiss, Günter (2015): 'Ride on the ferrous wheel'--the cycle of iron in macrophages in health and disease. In: *Immunobiology* 220 (2), S. 280–294. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.09.010.
- Oberhuber, R.; Ritschl, P.; Fabritius, C.; Nguyen, A-V; Hermann, M.; Obrist, P. et al. (2015): Treatment With Tetrahydrobiopterin Overcomes Brain Death-Associated Injury in a Murine Model of Pancreas Transplantation. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. DOI: 10.1111/ajt.13364.
- Oberhuber, Rupert; Cardini, Benno; Kofler, Markus; Ritschl, Paul; Oellinger, Robert; Aigner, Felix et al. (2014): Murine cervical heart transplantation model using a modified cuff technique. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (92), S. e50753. DOI: 10.3791/50753.
- Oberhuber, Rupert; Mittermair, Christof; Zelger, Bettina; Pirkebner, Daniela; Draxl, Anna; Weissenbacher, Annemarie et al. (2013): Rotational transport of islets: the best way for islets to get around? In: *BioMed research international* 2013, S. 975608. DOI: 10.1155/2013/975608.
- Puhr, Martin; Hoefer, Julia; Neuwirt, Hannes; Eder, Iris; Kern, Johann; Schäfer, Georg et al. (2014): PIAS1 is a crucial factor for prostate cancer cell survival and a valid target in docetaxel resistant cells. In: *Oncotarget* 5 (23), S. 12043-12056.
- Puhr, Martin; Hoefer, Julia; Schäfer, Georg; Erb, Holger H H; Oh, Su Jung; Klocker, Helmut et al. (2012): Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. In: *The American journal of pathology* 181 (6), S. 2188–2201. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.011.
- Reinstadler, Sebastian J.; Klug, Gert; Feistritzer, Hans-Josef; Kofler, Markus; Pernter, Bastian; Göbel, Georg et al. (2015): Prognostic value of left ventricular global function index in patients after ST-segment elevation myocardial infarction. In: *European heart journal cardiovascular Imaging*. DOI: 10.1093/ehjci/jev129.

Schmutzhard, Joachim; Glueckert, Rudolf; Pritz, Christian; Blumer, Michael J F; Bitsche, Mario; Lackner, Peter et al. (2013): Sepsis otopathy: experimental sepsis leads to significant hearing impairment due to apoptosis and glutamate excitotoxicity in murine cochlea. In: *Disease models & mechanisms* 6 (3), S. 745–754. DOI: 10.1242/dmm.011205.

Tober, R.; Banki, Z.; Egerer, L.; Muik, A.; Behmuller, S.; Kreppel, F. et al. (2014): VSV-GP: a Potent Viral Vaccine Vector That Boosts the Immune Response upon Repeated Applications. In: *Journal of Virology* 88 (9), S. 4897–4907. DOI: 10.1128/JVI.03276-13.

Wechselberger, K. M.; Taferner, B.; Beer, R.; Broessner, G.; Helbok, R.; Fischer, M. et al. (2013): NMDA-receptor mediated excitotoxicity is involved in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. In: *Journal of the Neurological Sciences* 333, S. e700. DOI: 10.1016/j.jns.2013.07.2418.

7. EINGWORBENE DRITTMITTEL (der abgeschlossenen MUI-START Projekte)

Projektleitung	Title des Vorhabens	Fördernummer und -organisation	Laufzeit des Projektes	Fördersumme
Natasha Hermann-Kleiter	Orphan receptor NR2F6 as a negative regulator of T cell effector functions	FWF – P23537-B13	36 Monate	€ 255.858,75
Wegene Borena	Genital HPV infection among HIV - positive men in West Austria in the Austrian HIV Cohort Study	MFF – Nr.262	18 Monate	€ 13.728,00
Christian Ploner	MADI	Tiroler Zukunft Stiftung	51 Monate	€ 73.466,98
Galina Apostolova	Role of genome organizer Satb2 in adult brain function	FWF - P25014-B24	36 Monate	€ 299.817,00
Birgit Frauscher	Motor activity during sleep in health and disease	FWF – KLI236	36 Monate	€ 203.609,70
Birgit Frauscher	REM sleep without atonia: early sign of neurodegeneration	ÖNB - 15127	30 Monate	€ 90.000
Peter Lackner	The role of voltage gated Ca channels for neuroprotection in experimental subarachnoid hemorrhage	SFB-F44/ Land Tirol	24 Monate	€ 75.400,00
Martin Puhr	Functional significance of PIAS1 and BIRC5 in docetaxel resistant prostate cancer	FWF – P25639-B19	30 Monate	€ 337.233,75
Markus Theurl	Catestatin for the treatment of myocardial ischemia	FWF – P26251-B24	24 Monate	€ 262.731,00
Rupert Oberhuber	Tetrahydrobiopterin as novel therapeutic strategy to improve outcome after the transplantation of organs from brain death donors	TWF-2013-1-17	24 Monate	€ 20.000,00

Eingeworbene Drittmittel

Selma Tuzlak	Bcl-2 family	ÖAW - 23949	36 Monate	€ 105.000,00
Manfred Nairz	Die Rolle von Innate Response Activator B Zellen bei Sepsis	FWF - J3486	24 Monate	€ 69.700,00
James Wood	Dopamine and NPY signaling in a fear extinction circuit	FWF - M1783	24 Monate	€ 157.380,00
Sebastian Herzog	Systematic analysis of the miR-26 family in lymphocyte development and cancer	TWF-2014-1-17	24 Monate	€ 26.500,00

8. EVALUATION der MUI-START Projekte

Im Sinne einer Optimierung von Effizienz und Qualität der intramuralen Forschungsförderung bot das dritte MUI-START Symposium die Gelegenheit, erstmals eine Abschluss- und Zwischenevaluation der Projekte durchzuführen. Diese wurde von der in die Auswahl förderungswürdiger MUI-START Projekte involvierten ReferentInnen durchgeführt.

Es wurden insgesamt 17 Projekte der 3 und 4 Antragsperiode evaluiert. Folgende Punkte wurden in der Evaluation beurteilt: die Entwicklung von Projekten, die Kompetenz der ProjektleiterInnen und das Potenzial der Ergebnisse als Basis für Publikationen oder einen zukünftigen Antrag auf Drittmittel.

Wie die Abbildung zeigt, wurde die Entwicklung der Projekte in 80% der Fälle als gut oder sehr gut beurteilt. Das Potenzial der Ergebnisse als Basis für Publikationen oder für einen zukünftigen Antrag auf Drittmittel wurde ebenfalls in mehr als 80% der Fälle als sehr gut bewertet.

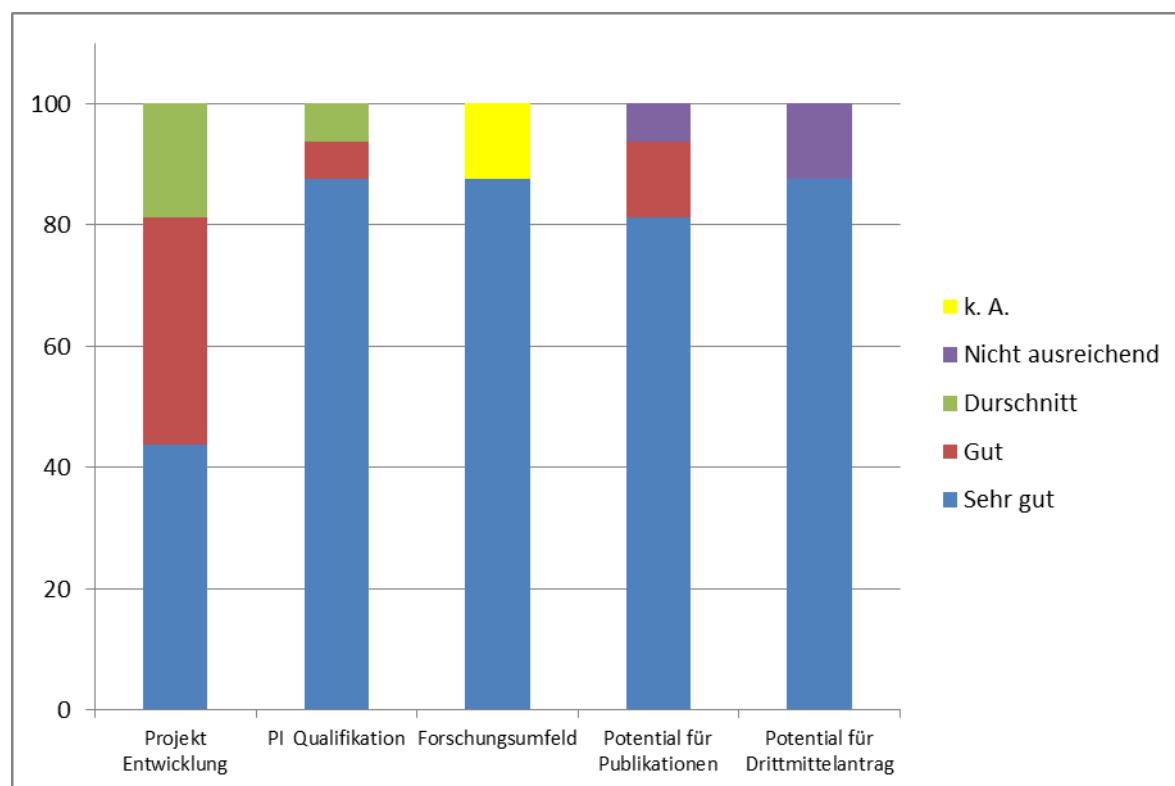


Abb. 1 Ergebnisse der Evaluation der MUI-START Projekte (3. und 4. Antragsperiode). k. A. keine Angabe

9. STATISTIKEN zu den MUI-START Projekten

- a) Alle AntragstellerInnen deren Antrag begutachtet wurde (1-5 Antragsperiode)

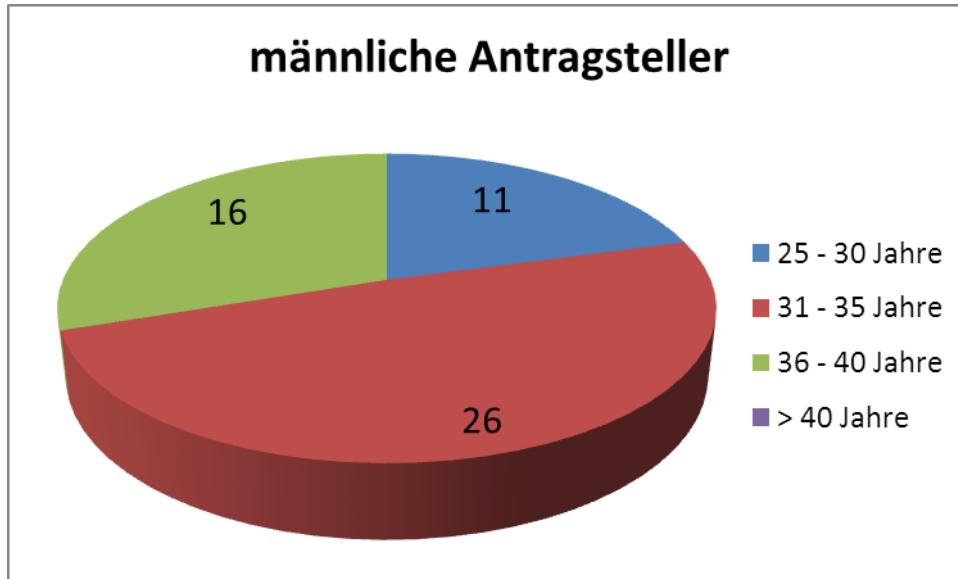


Abb. 2 Alle männlichen Antragsteller die einen MUI-START Antrag eingereicht haben.

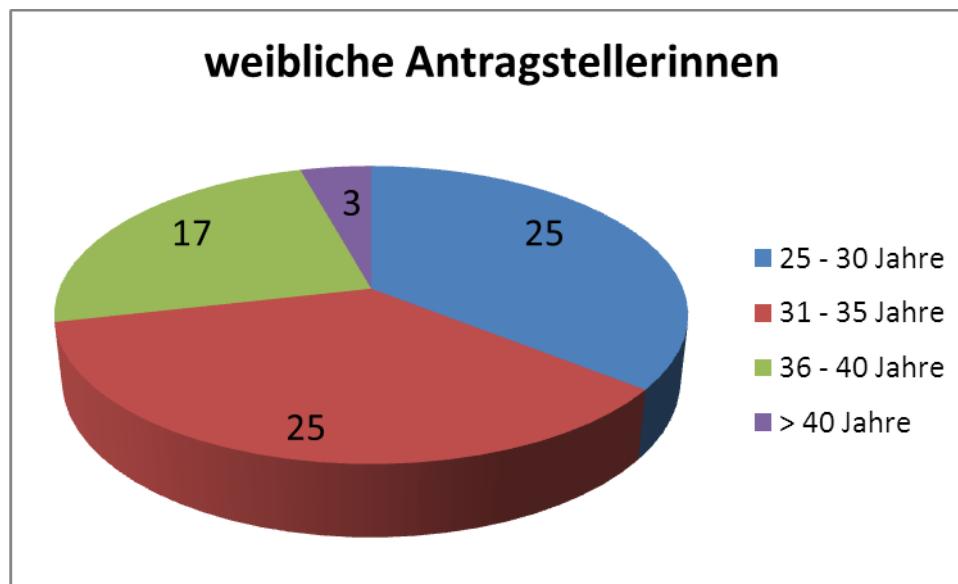


Abb. 3 Alle weiblichen Antragstellerinnen die einen MUI-START Antrag eingereicht haben.

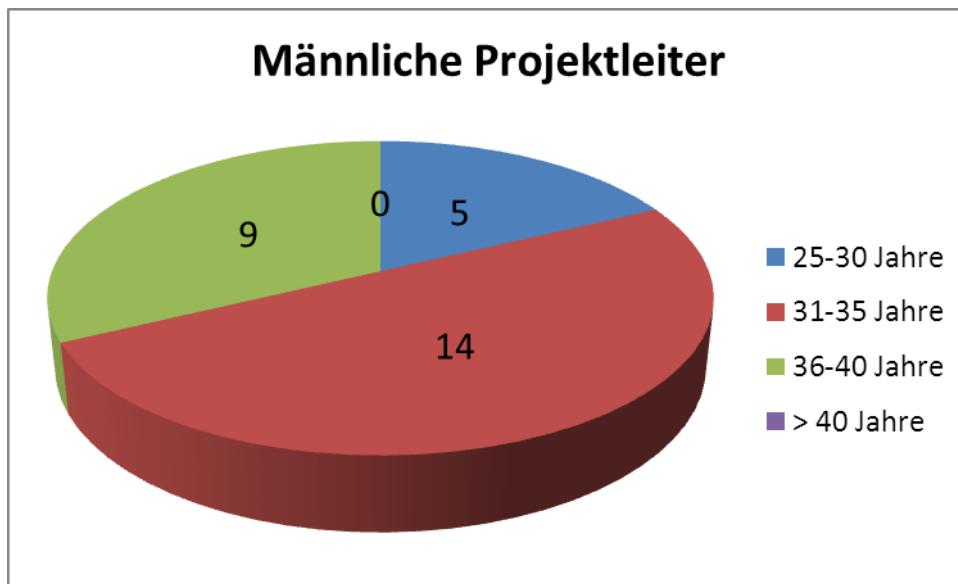
b) Alter der ProjektleiterInnen zum Zeitpunkt der Antragstellung (insgesamt 45)

Abb. 4 Männliche Projektleiter nach Alter (1.- 5. MUI-START Antragsperioden)

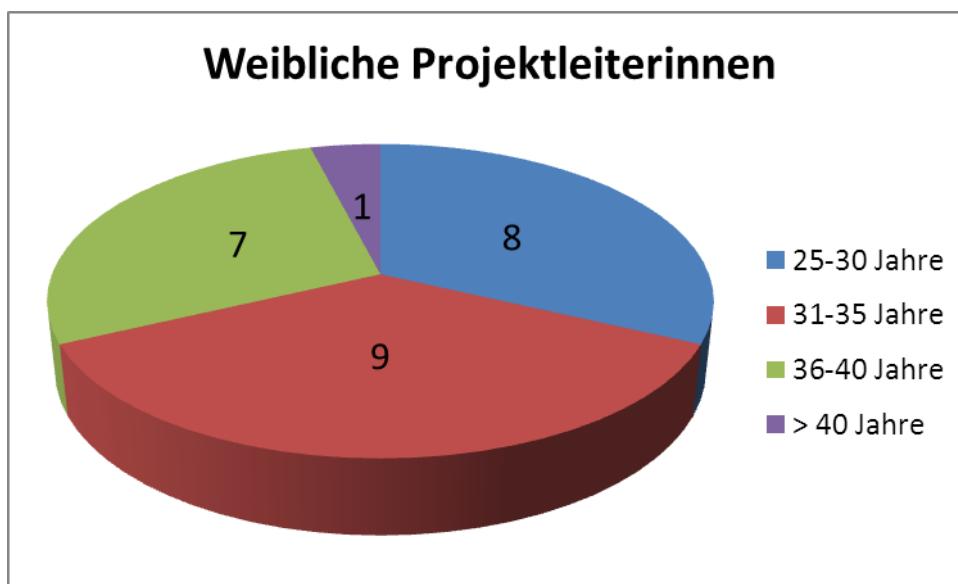


Abb. 5 Weibliche Projektleiterinnen nach Alter (1.-5 .MUI-START Antragsperioden)

c) Anzahl der MUI-START ProjektleiterInnen (1-5 Antragsperiode)

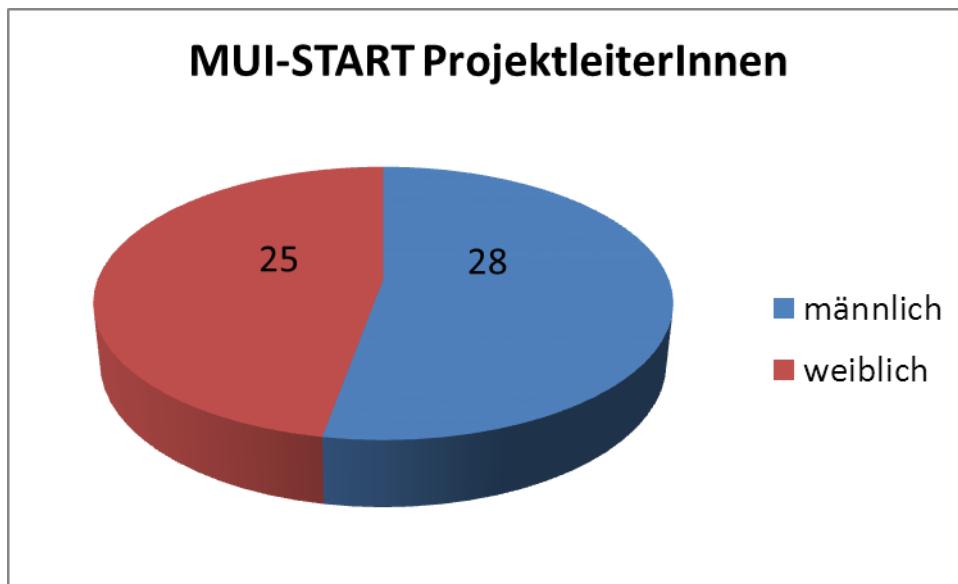


Abb. 6 Anzahl der männlichen und weiblichen Personen, die ein MUI-START Projekt leiten bzw. leiteten.

d) Anzahl der MUI-START ProjektleiterInnen nach Univ.-Klinik und Theoretischen Institut (1-5 Antragsperiode)

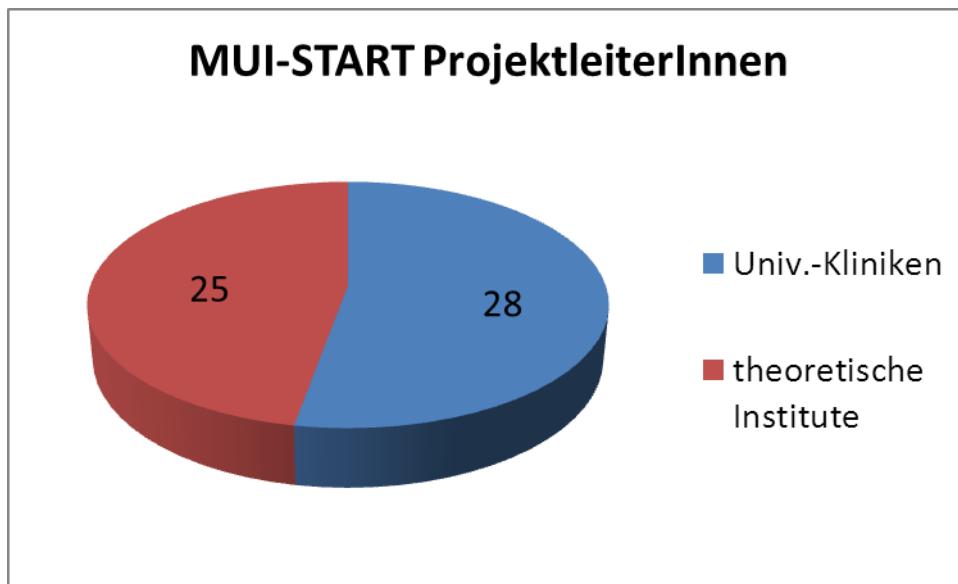


Abb. 7 MUI-START Projekte der ProjektleiterInnen aufgeteilt nach Universitätskliniken und theoretischen Instituten

10. FINANZIELLE ASPEKTE zu MUI-START

AUSGABEN LAUFENDE UND ABGESCHLOSSENE MUI-START-PROJEKTE

1. Antragsperiode

Projektleiter	Ausgaben 2011	Ausgaben 2012	Ausgaben 2013
Kleiter	16.478,03	14.437,27	0,00
Borena	7.500,00	1.500,00	0,00
Arora/Erhart	13.001,11	2.381,76	0,00
Ploner Ch.	20.495,74	8.637,25	0,00
Apostolova	12.645,90	33.609,77	5.056,43
Frauscher	28.513,56	15.262,39	3.485,85
Lackner	33.426,55	39.646,35	7.737,99
Puhr	20.099,15	47.090,71	13.492,59
Cima	9.964,85	17.631,27	4.094,22
Öllinger	21.089,19	31.867,75	5.704,46
Manzl	12.058,17	25.254,63	832,92
Theurl	25.430,41	36.173,38	2.336,62
Schrettl	25.682,25	45.250,22	5.064,85
GESAMT	246.384,91	318.742,75	47.805,93

2. Antragsperiode

Projektleiter	Ausgaben 2011	Ausgaben 2012	Ausgaben 2013
Ploner A.	23.000,00	0,00	0,00
Clementi	6.240,53	14.812,37	8.861,74
Hautz	3.999,34	32.918,71	17.160,71
Stichlberger	1.957,49	0,00	1.764,00
Oberhuber	6.096,85	12.564,25	6.497,72
GESAMT	41.294,21	60.295,33	34.284,17

3. Antragsperiode

Projektleiter	Ausgaben 2012	Ausgaben 2013	Ausgaben 2014
Tischner/ Tuzlak	6.300,59	6.997,78	0,00
Binder	7.750,06	8.985,10	13.264,00
Nairz	5.817,32	9.346,16	14.531,51
Blatzer	2.957,24	21.686,88	5.127,55

Finanzbericht

Kimpel	7.845,42	18.673,08	0,00
Sucher	7.881,40	10.260,51	11.467,66
Hagenbuchner	2.875,03	8.716,60	15.128,00
Schmutzhard	3.351,99	11.914,61	1.609,47
Dietmann	5.004,00	9.090,00	0,00
GESAMT	49.783,05	105.670,72	61.128,19

4. Antragsperiode

Projektleiter	Ausgaben 2013	Ausgaben 2014
Tasan	5.899,48	15.778,96
Siegmund	2.972,86	18.129,58
Griesmaier	2.677,08	5.825,41
Pfeifhofer- Obermair	5.811,21	15.131,77
Neuwirt	386,80	11.739,85
Brössner	867,08	6.071,36
Langeslag	2.046,99	18.596,06
Wood	3.538,34	5.414,51
Klug	0,00	5.616,00
Cardini	1.840,25	5.685,84
Schmidt	0,00	9.122,37
De Smet	4.005,95	8.847,36
Bodner	0,00	18.179,50
Herzog	12.011,38	6.457,82
GESAMT	42.057,42	150.596,39

5. Antragsperiode

Projektleiter	Ausgaben 2014
Zamarian	3.540,00
Grams	1.690,00
Kuzdas-Wood	94,32
Schiefermeier	0,00
Gleissenthall	1.690,00
Puhr	5.783,52
Gründlinger	0,00
Heidegger	0,00
Gostner	761,38
Rocamora-Reverte	4.936,22
Fava	454,80

Bauer	486,44
GESAMT	19.436,68

AUSGABEN NACH JAHREN GEGLIEDERT

	2011	2012	2013	2014	GESAMT
Personal	95.106,00	221.066,59	35.465,15	16.590,20	368.177,94
Sachmittel/Inv.	192.573,12	207.754,54	194.353,09	214.571,06	809.251,81
GESAMT	289.690,12	428.821,13	229.818,24	231.161,26	1.177.479,75

alle Beträge in EUR

Danksagung

Danksagung

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

- Bettina Krüger und María T. Pérez Mediavilla, die die MUI-START-Projekte betreuen und die Begutachtungsverfahren organisiert haben.
- Nadine Nössing und María T. Pérez Mediavilla, die die Berichte der Projektleiter/innen sowie diesen Bericht zusammengestellt haben
- Reinhard Tschaudt und Damla Celikel, die die Finanzen zusammengefasst haben
- Wolfram Rieneck und Angelina Klein, die den Bericht Korrektur gelesen haben.

Dr. Peter Josten

Anhang:

Antragsrichtlinien MUI-START

1. Förderperiode:

http://www.i-med.ac.at/forschung/files/Richtlinien_MUI_Start_Antragsperiode_1.pdf

2. Förderperiode:

http://www.i-med.ac.at/forschung/files/Richtlinien_MUI_Start_Antragsperiode_2.pdf

3. Förderperiode:

http://www.i-med.ac.at/forschung/files/Richtlinien_MUI_Start_Antragsperiode_3.pdf

4. Förderperiode:

http://www.i-med.ac.at/forschung/files/Richtlinien_MUI_Start_Antragsperiode_4.pdf

5. Förderperiode:

http://www.i-med.ac.at/forschung/files/Richtlinien_MUI-START_Antragsperiode-5_Neu.pdf

6. Förderperiode:

http://www.i-med.ac.at/forschung/files/20150206_Richtlinien_MUI-START_6-Ausschreibung.pdf

Kontaktdaten der MUI-START ProjektleiterInnen (abgeschlossene Projekte)

Dr.rer.nat Galina Apostolova

Gemeinsame Einrichtung für Neurowissenschaften
Medizinische Universität Innsbruck
MZA, Anichstrasse 35
6020 Innsbruck
E-Mail: Galina.Apostolova@i-med.ac.at

Mag.rer.nat Ulrike Binder Ph.D.

Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Schöpfstr. 41/3. Stock
6020 Innsbruck
E-Mail: Ulrike.Binder@i-med.ac.at

MMag Michael Blatzer Ph.D.

Sektion für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Schöpfstr. 41/3. Stock
6020 Innsbruck
E-Mail: Michael.Blatzer@i-med.ac.at

Dr. med. Katharina Cima

Abt. Lungenkrankheiten
Landeskrankenhaus Natters
In der Stille 20
6161 Natters
E-Mail: Katharina.cima@tilak.at

Mag. Nina Clementi, PhD

Sektion für Genomik und RNomik
Biozentrum
Innrain 80/82
6020 Innsbruck
E-Mail: Nina.Clementi@i-med.ac.at

Anelia Dietmann, MD, PhD

Universitätsklinik für Neurologie
Universitätsspital Bern
Freiburgstraße 4
3010 Bern, Schweiz
E-Mail: Anelia.dietmann@gmail.com

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Birgit Frauscher

Universitätsklinik für Neurologie
Anichstrasse 35

6020 Innsbruck
E-Mail: Birgit.Frauscher@i-med.ac.at

Dipl.-Ing. Dr.rer.nat. Judith Hagenbuchner
Universitätsklinik für Pädiatrie II
Anichstrasse 35,
6020 Innsbruck
E-Mail: Judith.Hagenbuchner@i-med.ac.at

Dr.med.univ. Theresa Maria Hautz
Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie
D. Swarovski Forschungslabor
Innrain 66, 6. Stock
6020 Innsbruck
E-Mail: Threresa.Hautz@i-med.ac.at

Dr.rer.nat. Sebastian Herzog
Sektion für Entwicklungsimmunologie
Biozentrum
Innrain 80/82
6020 Innsbruck
E-Mail: Sebastian.Herzog@i-med.ac.at

Dr. phil. nat. Alexandra Janine Kimpel
Sektion für Virologie
Peter-Mayr-Strasse 4b
6020 Innsbruck
E-Mail: Janine.Kimpel@i-med.ac.at

Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. Gert Klug
Universitätsklinik für Innere Medizin III,
Kardiologie und Angiologie
Anichstrasse 35,
6020 Innsbruck
E-Mail: Gert.Klug@i-med.ac.at

Dr.rer.nat Claudia Manzl
Sektion für Allgemeine Pathologie
Müllerstrasse 44
6020 Innsbruck
E-Mail: Claudia.Manzl@i-med.ac.at

Dr.med.univ. Manfred Nairz PhD
Universitätsklinik für Innere Medizin VI
Anichstrasse 35

Kontaktdaten

6020 Innsbruck

E-Mail: Manfred.Nairz@i-med.ac.at

Priv.-Doz. Dr.med.univ. Peter Lackner

Universitätsklinik für Neurologie

Anichstrasse 35

6020 Innsbruck

E-Mail: Peter.Lackner@i-med.ac.at

Dr.med.univ. Rupert Oberhuber

Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie

Anichstrasse 35

6020 Innsbruck

E-Mail: Rupert.Oberhuber@i-med.ac.at

ao.Univ.-Prof. Dr.med.univ. Robert Öllinger

Universitätsklinik für Visceral-, Transplantations- und Thoraxchirurgie

Anichstrasse 35

6020 Innsbruck

E-Mail: Robert.Oellinger@i-med.ac.at

Mag.rer.nat. Martin Puhr PhD

Universitätsklinik für Urologie

Anichstrasse 35

6020 Innsbruck

E-Mail: Martin.Puhr@i-med.ac.at

Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Joachim Schmutzhard

Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Anichstrasse 35

6020 Innsbruck

E-Mail: Joachim.Schmutzhard@i-med.ac.at

Mag. Dr. Markus Schreitl, PhD

Sandoz

Biochemiestraße 10

6250 Kundl

E-Mail: Markus.Schreitl@sandoz.com

Dr.med.univ. Martina Stichlberger

Universitätsklinik für Anästhesie und Intensivmedizin

Anichstrasse 35

6020 Innsbruck

E-Mail: Martina.Stichlberger@i-med.ac.at

Dr. med. univ. Robert Sucher

Klinik für Allgemein-Visceral-und Transplantationschirurgie Charité
Universitätsmedizin Berlin
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin
E-Mail: Robert.Sucher@charite.de

Dr.med.univ. Markus Franz Theurl

Universitätsklinik für Innere Medizin III
Anichstrasse 35
6020 Innsbruck
E-Mail: Markus.Theurl@i-med.ac.at

Selma Tuzlak M.Sc.

Sektion für Entwicklungimmunologie
Biozentrum
Innrain 80/82
6020 Innsbruck
E-Mail: Selma.Tuzlak@i-med.ac.at

James Wood Ph. D.

Institut für Pharmakologie
Peter-Mayr-Straße 1a
6020 Innsbruck
E-Mail: James.Wood@i-med.ac.at