

## Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

### Lehrstuhl für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology

Chair of Clinical Pharmacology and Toxicology

Fahrstr. 17, 91054 Erlangen

Tel.: ++49 (0)9131 / 85-22198

Fax: ++49 (0)9131 / 85-22773

<http://www.pharmakologie.uni-erlangen.de/>

E-Mail: [gregor@pharmakologie.med.uni-erlangen.de](mailto:gregor@pharmakologie.med.uni-erlangen.de)

**Ansprechpartner / Contact:**

Frau Edith Gregor

Tel.: ++49 (0)9131 / 85-22198

E-Mail: [gregor@pharmakologie.med.uni-erlangen.de](mailto:gregor@pharmakologie.med.uni-erlangen.de)

### Hochschullehrer / Professors and Junior Faculty

		E-Mail	Telefon
Fromm, Martin F.	Prof. Dr. med.	<a href="mailto:fromm@pharmakologie.med.uni-erlangen.de">fromm@pharmakologie.med.uni-erlangen.de</a>	-22198, -22772
<i>Lehrstuhlinhaber / Chairman</i>			
Böcker, Ronald	Prof. Dr. rer. nat.	<a href="mailto:boecker@pharmakologie.med.uni-erlangen.de">boecker@pharmakologie.med.uni-erlangen.de</a>	-22258
König, Jörg	PD Dr. rer. nat.	<a href="mailto:joerg.koenig@pharmakologie.med.uni-erlangen.de">joerg.koenig@pharmakologie.med.uni-erlangen.de</a>	-22077

### Forschungsschwerpunkte

- Individualisierte Arzneimitteltherapie
- Intestinale und hepatische Arzneimitteltransportproteine
- Kardiovaskuläre Pharmakologie

### Research Focus

- Personalized Medicine
- Intestinal and Hepatic Drug Transporters
- Pharmacology of the Heart

## 1. Individualisierte Arzneimitteltherapie

Selbst bei bestimmungsgemäßer Verwendung von Arzneimitteln beobachtet man bei einem Teil der Patienten überhaupt keinen erwünschten Therapieeffekt, während man bei einem anderen Teil unerwünschte Arzneimittelwirkungen auftreten. Diese Variabilität in der Arzneimittelwirkung kann genetisch, aber auch durch Umweltfaktoren (z.B. Nahrung, Begleitmedikation) bedingt sein. Ziel unserer Arbeitsgruppe (Dr. I. Bachmakov, Dr. F. Mörl, Dr. H. Gläser, PD Dr. J. König, Prof. Dr. M.F. Fromm) ist es, die Ursachen der interindividuellen Unterschiede in der Arzneimittelwirkung besser zu verstehen und damit einen Beitrag zur weiteren Optimierung der Arzneimitteltherapie zu leisten.

Viele Arzneimittel werden im Körper durch verschiedene Transporterproteine (z.B. P-Glykoprotein) durch Zellmembranen transportiert. Daneben spielt der Stoffwechsel eine wichtige Rolle für die Pharmakokinetik und Wirkung von Arzneimitteln. Im besonderen lieferten unsere *in vitro*- und *in vivo*-Arbeiten neue Erkenntnisse in den folgenden drei Forschungsgebieten: (1) Bedeutung des Arzneimittelstoffwechsels in der Dünndarmmukosa, (2) Charakterisierung von Arzneimitteln als Substrate und Inhibitoren von Transportern (z.B. P-Glykoprotein, OATP), sowie (3) Einfluss des Genotyps auf die Expression und Funktion von Arzneimitteltransportern.

## 1. Personalized Medicine

In spite of the correct use of drugs, a significant proportion of the patients has no adequate drug effect or suffers from drug toxicity. This variability in drug effects can be due to genetic or environmental (e.g. nutrition, co-medication) factors. The goal of our group (Dr. I. Bachmakov, Dr. F. Mörl, Dr. H. Gläser, PD Dr. J. König, Prof. Dr. M.F. Fromm) is to help to get a better understanding of the causes for interindividual differences in drug effects and to further optimize drug treatment. It is now well established that many drugs are translocated through cell membranes via different transporter proteins. In addition to drug transport, metabolism is also an important determinant of drug disposition and effects. In particular, we generated new data with our *in vitro*- and *in vivo*-studies in the following topics: (1) Importance of drug metabolism in the intestine, (2) Characterization of drugs as substrates and inhibitors of transporters (e.g. P-glycoprotein, OATP) and (3) Impact of genotype on the expression and function of drug transporters.

### Ausgewählte Publikationen / Selected publications

- Dilger K, Schwab M, Fromm MF (2004) Identification of budesonide and prednisone as substrates of the intestinal drug efflux pump P-glycoprotein. *Inflamm Bowel Dis* 10: 578-583
- Eichelbaum M, Fromm MF, Schwab M (2004) Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. *Ther Drug Monit* 26: 180-185
- Fromm MF (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25: 423-429
- Glaeser H, Drescher S, Hofmann U, Heinkele G, Somogyi AA, Dent J, Eichelbaum M, Fromm MF (2004) Impact of concentration and rate of intraluminal drug delivery on absorption and gut wall metabolism of verapamil in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 76: 230-238

Hitzl M, Schaeffeler E, Hoher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, Kaufmann P, Fritz P, Fromm MF, Schwab M (2004) Variable expression of P-glycoprotein in human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 14: 309-318

Kivistö KT, Niemi M, Fromm MF (2004) Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Fundam Clin Pharmacol* 18: 621-626

Kivistö KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkälä K, Tilvis R, Fromm MF, Schwab M, Eichelbaum M, Strandberg T (2004) Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 14: 523-525

Kivistö KT, Zukunft J, Hofmann U, Niemi M, Rekersbrink S, Schneider S, Luippold G, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2004) Characterization of cerivastatin as a P-glycoprotein substrate: Studies in P-glycoprotein-expressing cell monolayers and *mdr1a/b* knock-out mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370: 124-130

Lang T, Hitzl M, Burk O, Mornhinweg E, Keil A, Kerb R, Klein K, Zanger UM, Eichelbaum M, Fromm MF (2004) Genetic polymorphisms in the multidrug resistance protein 3 (ABCC3, MRP3) gene and relationship to its mRNA and protein expression in human liver. *Pharmacogenetics* 14: 155-164

von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivistö KT (2004) Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin Pharmacol Ther* 75: 172-183

Werner D, Wuttke H, Fromm MF, Schaefer S, Eschenhagen T, Brune K, Daniel WG, Werner U (2004) Effect of amiodarone on the plasma levels of metoprolol. *Am J Cardiol* 94: 1319-1321

Bachmakov I, Rekersbrink S, Hofmann U, Eichelbaum M, Fromm MF (2005) Characterisation of (R/S)-propafenone and its metabolites as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 195-201

Burk O, Arnold KA, Nussler AK, Schaeffeler E, Efimova E, Avery BA, Avery MA, Fromm MF, Eichelbaum M. (2005) Antimalarial artemisinin drugs induce CYP and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 67: 1954-1965

Cheremina O, Bachmakov I, Brune K, Fromm MF, Hinz B (2005) Simultaneous determination of oxycodone and its major metabolite, noroxycodone, in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 19: 777-782

Fromm MF, Schmidt BMW, Pahl A, Jacobi J, Schmieder RE (2005) CYP3A5 genotype is associated with elevated blood pressure. *Pharmacogenet Genomics* 15: 737-741

Glaeser H, Drescher S, Eichelbaum M, Fromm MF (2005) Influence of rifampicin on the expression and function of human intestinal cytochrome P450 enzymes. *Br J Clin Pharmacol* 59: 199-206

Kivistö KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkälä K, Tilvis R, Fromm MF, Schwab M, Lang F, Eichelbaum M, Strandberg T (2005) CYP3A5 genotype is associated with diagnosis of hypertension in elderly patients: data from the DEBATE study. *Am J Pharmacogenomics* 5: 191-195

Lamprecht C, Werner U, Werner D, Schaefer S, Renner B, Fromm M, Brune K. (2005) Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on heart rate in healthy young men. *Am J Cardiol* 95: 1531-1532

Schwarz UI, Seemann D, Oertel R, Miehke St, Kuhlisch E, Fromm MF, Kim RB, Bailey DG, Kirch W (2005) Grapefruit juice ingestion significantly reduces talinolol bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* 77: 291-301

Bachmakov I, Werner U, Endress B, Auge D, Fromm MF (2006) Characterization of  $\beta$ -adrenoceptor antagonists as substrates and inhibitors of the drug transporter P-glycoprotein. *Fundam Clin Pharmacol* 20: 273-282

Becquemont L, Glaeser H, Drescher S, Hitzl M, Simon N, Murdter TE, Heinkele G, Hofmann U, Schaefer Ch, Burk O, Verstuyft C, Eichelbaum M, Fromm MF (2006) Effects of ursodeoxycholic acid on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4-dependent pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther* 79: 449-460

Thuerauf N, Fromm MF (2006) The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256: 281-286

Werner U, Lamprecht C, Werner D, Schäfer S, Wuttke H, Hinz B, Fromm MF, Brune K (2006) Valdecoxib does not interfere with the CYP2D6 substrate metoprolol. *Int J Clin Pharmacol Ther* 44: 397-400

## 2. Intestinale und hepatische Arzneimitteltransportproteine

Transportproteine in Zellmembranen sind eine Voraussetzung für die Aufnahme, die gezielte Verteilung und die gerichtete Exkretion von Arzneimitteln. Prinzipiell können zwei große Gruppen von Transportproteinen unterschieden werden. Zum einen Aufnahmetransporter, welche Substanzen aus der Umgebung in Zellen transportieren. Hierbei liegt der Fokus unserer Forschungen vor allem auf der funktionellen Charakterisierung von Mitgliedern der humanen OATP-Familie (OATP = Organic Anion Transporting Polypeptides), welche die Aufnahme organischer Anionen in Zellen vermitteln. Den Aufnahmetransportern gegenüber stehen die Exportpumpen, welche unter Energieverbrauch Substanzen aus Zellen exportieren (ABC-Transporter). Hierbei werden vor allem Mitglieder der MRP-Familie und das P-Glykoprotein analysiert. Ein Schwerpunkt unserer Forschung (PD Dr. J. König, Dr. H. Gläser, S. Eberl, A. Seithel, U. Gradhand, Prof. Dr. M.F. Fromm) liegt auf der Identifizierung und Charakterisierung von Transportproteinen, die in Enterozyten des Dünndarms und in der Leber für die Aufnahme und den Export von Arzneimitteln verantwortlich sind. In einer ersten Untersuchung zur Expression von Transportproteinen im Dünndarm zeigte sich die höchste mRNA-Expression für *OATP4A1* gefolgt von *OATP2B1*, *OATP3A1* und *OATP1A2*. Bezüglich der Lokalisation von *OATP2B1* konnte die bereits beschriebene Expression im apikalen Bürstensaum der Enterozyten bestätigt werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Richard B. Kim (Lawson Health Center, London Ontario, Canada) gelang für *OATP1A2* auch der Expressionsnachweis in der apikalen Membran der Enterozyten. Somit war es möglich, den Einfluss von Grapefruitsaft auf die Pharmakokinetik von Fexofenadin (Telfast®) zu erklären. Bei gleichzeitiger Einnahme von Fexofenadin und Grapefruitsaft wurde eine deutliche Abnahme der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) beobachtet, welche zum großen Anteil durch die Hemmung von *OATP1A2* durch Grapefruit bedingt ist (Glaeser et al.). Im Weiteren wurde für *OATP4A1* im Gegensatz zu *OATP1A2* und *OATP2B1* die basolaterale Expression in humanen Enterozyten nachgewiesen. Die aktuellen Forschungen konzentrieren sich nun auf die Identifizierung von endogenen und xenobiotischen Substraten für *OATP4A1*. Dafür werden HEK293 Zellen verwendet, welche stabil *OATP4A1* überexprimieren. Für diese Zellen wurde die Expression von *OATP4A1* auf mRNA- und Proteinebene sowie die Lokalisation durch Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen.

Untersuchungen zur Regulation und zum Transport von Arzneimitteln standen im Mittelpunkt der Analysen hepatischer Transportproteine. Mit Hilfe von Reportergeräten wurde der Einfluss des Polymorphismus -211C>T in der 5'-regulatorischen Region der Exportpumpe MRP3 (ABCC3) untersucht (Gradhand et al.). Das MRP3 Protein transportiert vor allem endogene Glukuronid-Konjugate und konjugierte Arzneimittelmetabolite. Verschiedene *in vivo* Untersuchungen ließen vermuten, dass der -211C>T Polymorphismus einen Einfluss auf die mRNA-Expression des MRP3 Proteins hat. Unsere Reportergeräten

analysen konnten jedoch keinen Einfluss dieser Sequenzvariation auf die Expression der *MRP3* mRNA belegen. Auch auf den in unmittelbarer Nähe bindenden, transkriptionsaktivierenden Effekt des Transkriptionsfaktors FTF hatte diese Sequenzvariation keinen Einfluss (Gradhand et al.). Expressionsanalysen des ebenfalls in der Leber exprimierten MRP-Familienmitglieds MRP4 (ABCC4) zeigten, dass diese Exportpumpe unter cholestatischen Bedingungen signifikant hochreguliert wird. Sie belegen somit die mögliche Rolle dieses Transporters beim Schutz des Hepatozyten unter den pathologischen Bedingungen einer Cholestase, indem es Gallensäuren über die basolaterale Membran ins Blut transportiert.

Die Rolle der Aufnahmetransporter für den Arzneimitteltransport findet in letzter Zeit starker Beachtung und dementsprechend werden auch immer mehr Arzneimittel als Transportsubstrate für OATP-Familienmitglieder identifiziert (König et al.). Aufgrund ihrer Transportfunktion für Arzneimittel sind Aufnahmetransporter auch ein weiteres, molekulares Target für Arzneimittelinteraktionen und können somit an Arzneimittelnebenwirkungen beteiligt sein. Mit Hilfe von Aufnahmeexperimenten wurde der Einfluss verschiedener Makrolide auf den Transport von organischen Anionen und von Pravastatin, vermittelt durch die hepatozyten-spezifischen OATP-Familienmitglieder *OATP1B1* und *OATP1B3* untersucht (Seithel et al.). Diese Daten belegen, dass Makrolide in der Lage sind, konzentrationsabhängig den OATP-vermittelten Transport zu inhibieren und somit, dass auch Aufnahmetransporter an Arzneimittelinteraktionen beteiligt sein können. Weiterführende *in vitro* Analysen mit Hilfe einfachtransfizierter und mehrfachtransfizierter Zellmodelle (Kopplow et al.) sollen die Rolle von Aufnahmetransportern und Exportpumpen und deren Zusammenspiel beim Arzneimitteltransport und bei möglichen Arzneimittelinteraktionen im Detail aufklären.

## 2. Intestinal and hepatic drug transporters

Characterization of transport proteins involved in the uptake of drugs into the body, in the distribution into different organs and in the elimination of drugs or drug metabolites from the organism is increasingly regarded as an important step during drug development. Transport proteins can be arranged into two major groups: Uptake transporters mediating the uptake of substances into cells and ATP-driven export pumps (ABC transporters) mediating the energy dependent secretion of substances out of cells. Within the focus of our research are members of the OATP family of uptake transporters and members of the MRP family and the drug transporter P-glycoprotein as members of the ATP transporter superfamily. Key aspects of our work are the molecular identification and characterization of transport proteins, mediating the uptake of drugs into enterocytes of the small intestine and drug transporting proteins expressed in human hepatocytes.

To gain more insight into transporters expressed in enterocytes a semiquantitative Real-Time PCR was conducted and showed the highest expression for *OATP4A1* followed by *OATP2B1*,

OATP3A1, and OATP1A2 when normalized to the enterocyte-specific expressed villin mRNA. In addition, our studies also confirmed the localization of OATP2B1 in the apical membrane of human enterocytes. In cooperation with Prof. Richard B. Kim (Lawson Health Center, London Ontario, Canada) it was possible to detect the localization of the OATP1A2 protein in the apical membrane of enterocytes. Thereby we were able to explain the impact of grapefruit juice on the pharmacokinetic of orally administered fexofenadine (Telfast®). The simultaneous administration of fexofenadine and grapefruit juice leads to a profound decrease of the plasma AUC (area under the curve) of fexofenadine. The inhibition of intestinal OATP1A2 by grapefruit juice is in part responsible for the change in the pharmacokinetics of fexofenadine (Glaeser et al.) Moreover, in contrast to OATP1A2 and OATP2B1, OATP4A1 was detected in the basolateral membrane of enterocytes. In our recent studies we try to identify endogenous and exogenous substrates for OATP4A1 using a stable overexpressing OATP4A1-HEK293 cell line. The mRNA expression, protein expression and membrane localization of OATP4A1 in this cell line were characterized using semiquantitative Real-Time PCR, immunoblot analysis and immunofluorescence analysis.

In the analysis of drug transporters expressed in human hepatocytes we focused on the transcriptional regulation of the basolaterally localized export pumps MRP3 (ABCC3) and MRP4 (ABCC4) and on drug transport and drug induced transport inhibition of OATP proteins. Using reporter gene analyses the influence of the frequent polymorphism -211C>T, located in the promoter region of the *MRP3* gene was analyzed. In humans the hepatic expression of the *MRP3* gene seems to be influenced by this polymorphism. Interestingly, our in vitro studies did not reveal any influence of the -211C>T polymorphism on the reporter gene activity (Gradhand). Furthermore, the transcription factor FTF (Fetoprotein Transcription Factor) binding to elements near the -211 polymorphism increased promoter activity but independently of the -211 SNP. The expression of the MRP4 protein was analyzed in cholestatic and non-cholestatic human liver samples. These studies demonstrated that in cholestatic patients both the *MRP4* mRNA and protein expression were significantly up-regulated compared to non-cholestatic liver samples. This further supports a role of MRP4 in adaptive processes to cholestasis.

Drug transport and drug induced transport inhibition has been analyzed using stably transfected cells expressing OATP1B1 and OATP1B3 the major human hepatic uptake transporters of the OATP family (König et al.). One study demonstrated that macrolides, known to cause severe drug interactions due to the inhibition of metabolizing enzymes, are also inhibitors of OATP1B1- and OATP1B3 mediated transport. In this study we used the anion bromosulphophthalein and the HMG-CoA-reductase inhibitor pravastatin as substrates. These results demonstrated that alterations of uptake transporter function by certain drugs have to be considered as a potential additional mechanism underlying drug-drug interactions. Further studies are necessary to gain more insight into the potential role of drug transporting proteins in drug-induced transport inhibition and

resulting drug side effects. Therefore, several cell systems have been established recombinantly expressing transport proteins. Of special interest for the analysis of vectorial transport processes during the hepatobiliary elimination of drugs are multi-transfected cell lines (Kopplow et al.). These cell lines will be useful in the future to analyze uptake and export of drugs in one defined cell system.

#### Ausgewählte Publikationen / Selected publications

Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KT (2004) High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLC01B1). *Pharmacogenetics* 14: 429-440

Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B, Keppler D (2005) Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol* 68: 1031-1038

König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF (2006) Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372: 432-443

Niemi M, Kivistö KT, Diczfalusy U, Bodin K, Bertilsson L, Fromm MF, Eichelbaum M (2006) Effect of SLC01B1 polymorphism on induction of CYP3A4 by rifampicin. *Pharmacogenet Genomics* 16: 565-568

Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Björquist A, Ungell A-L (2006) Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 28: 291-299

### 3. Kardiovaskuläre Pharmakologie

#### Funktionalisierte Carbon-Nanoröhren als Vehikel zur Einschleusung bioaktiver Moleküle in Zellen

Mit der Entdeckung der sog. RNA-Interferenz gelang es die Applikation von „small interfering RNA“ (siRNA) als gentherapeutische Möglichkeit, krankmachende Gene auszuschalten, in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die lipophile Natur der Zellmembranen behindert allerdings die Aufnahme von siRNA in die Zelle und macht die Transfektion zu einem Schlüsselproblem in der Gentherapie. Unsere Arbeitsgruppe (R. Krajcik, Dr. O. Zolk) untersuchte, ob chemisch modifizierte Kohlenstoff-Nanoröhren (CNTs) als Vehikel zur Einschleusung von siRNA in Herzmuskelzellen geeignet sind, indem die folgenden Fragestellungen bearbeitet wurden: (1) Erarbeitung geeigneter Methoden der chemischen Funktionalisierung der CNTs, (2) Visualisierung der CNTs zur Kontrolle ihrer intrazellulären Aufnahme mittels konfokaler und elektronenmikroskopischer Untersuchungen, (3) Bestimmung der Bindungskapazität der modifizierten CNTs für siRNA, (4) Effektivität der siRNA-induzierten Expressionsminderung des Zielgens und (5) Untersuchung der zytotoxischen Wirkung der funktionalisierten CNTs. Unsere Ergebnisse belegen, dass funktionalisierte CNTs – bei ausgezeichneter Biokompatibilität – geeignet sind, um siRNA effektiv in Herzmuskelzellen einzuschleusen, was eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung in der Gentherapie darstellt.

**Expression und Funktion von ABC-Transportern im Herzen**  
Sog. ATP-binding cassette- (ABC-) Transporter sind an dem energieabhängigen Transport von Molekülen durch Zellmembranen beteiligt. Ihre wichtigste Funktion besteht darin, im Sinne eines Schutzmechanismus die Aufnahme von Fremdstoffen

(einschließlich Arzneistoffe) in die Zelle zu limitieren. Außerdem regulieren sie Ionenströme durch die Zellmembran. Ziel unserer (B. Paulus, Dr. O. Zolk, Prof. Dr. M.F. Fromm) Arbeit war die systematische Untersuchung der Expression aller bisher bekannten 48 ABC-Transporter im menschlichen Herzen. Die Untersuchung von Gewebeproben von Patienten mit einer hochgradigen Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Herzen erlaubte die Identifizierung von solchen Transportern, die in den kranken Herzen verändert exprimiert werden. Die mRNA von SUR1 (sog. pankreasspezifische Untereinheit der  $K_{ATP}$ -Kanäle) war im insuffizienten Myokard signifikant vermehrt (4-fach), während die Isoform SUR2A im insuffizienten Myokard unverändert exprimiert war. Weiter fand sich eine signifikante Hochregulation des Xenobiotika-Transporters ABCG2 im insuffizienten Myokard (3,6-fach). In Übereinstimmung mit Daten von Tiermodellen der Herzinsuffizienz war die mRNA-Expression des Chlorid-Kanals CFTR auch bei der menschlichen Herzinsuffizienz signifikant reduziert (3,5-fach). Die veränderte Chlorid-Leitfähigkeit durch Abnahme der CFTR-Kanäle oder eine veränderte Zusammensetzung der  $K_{ATP}$ -Kanäle im insuffizienten Myokard könnte mit einem erhöhten Arrhythmie-Risiko einhergehen. Die Untersuchung des Einflusses der im Herzen exprimierten Xenobiotika-Transporter auf die kardiale Verfügbarkeit von Arzneistoffen ist ein Schwerpunkt unserer weiteren Arbeit.

### 3. Pharmacology of the heart

#### Functionalized carbon nanotubes as carriers of bioactive molecules

With the discovery of so called RNA interference, applications of small interfering RNA (siRNA) in gene therapy, i.e. knock down of genes that are pathogenic to the host organism, obviously become possible. The lipophilic nature of the cell membranes, however, restricts the direct intracellular delivery of siRNA and makes intracellular transport to one of the still unresolved key problems. We (R. Krajcik, Dr. O. Zolk) investigated whether chemically modified single walled carbon nanotubes (CNTs) might be used as a vehicle for siRNA by addressing several questions: (1) Purification/functionalization of single walled CNTs, which was confirmed by Raman spectroscopy and atomic force microscopy. (2) Visualization of CNTs within the cell by confocal microscopy using fluorescently labeled CNTs and by transmission electron microscopy using CNTs labelled with gold nano-particles. (3) Assessment of the binding capacity of modified CNTs for siRNA. (4) Exploration of the gene silencing capabilities of different siRNAs, which were transported into cells by functionalized CNTs. (5) Investigation of the cellular toxicity of CNTs. The results of our in vitro studies in isolated cardiomyocytes suggest that functionalized single walled CNTs might be used as a vehicle for siRNA, which meets basic requirements for a wide use in gene therapy, such as efficient transport of siRNA into cells, the liberation of siRNA from the nano-carrier for efficient gene silencing, and a sufficient biocompatibility.

**Expression and function of ABC transporters in the heart**  
ATP-binding cassette (ABC) transporters are involved in energy-dependent transport of substrates across biological membranes. Their major function is to limit the entry of xenobiotics/drugs into tissues, or to regulate ion currents. While expression and function have been extensively investigated in liver, intestine or kidney, little information exists for the heart. We (B. Paulus, Dr. O. Zolk, Prof. Dr. M.F. Fromm) investigated the gene expression of all 48 human ABC transporters by real-time PCR in human left ventricular tissue specimens from non-failing and failing hearts (NYHA III-IV). Protein expression was analyzed by Western blots and immunohistochemistry. This approach allowed us to identify ABC transporters regulated during heart failure: mRNA levels of ABCA6 and ABCA8-10 (clustered on 17q24), ABCC8 (=SUR1, constituent of  $K_{ATP}$  potassium channels), and ABCG2 (=BCRP, xenobiotic transporter) were significantly augmented (up to 4-fold) in failing hearts compared to non-failing controls, whereas mRNA expression of ABCC5 (export pump for cyclic nucleotides) and ABCC7 (=CFTR chloride channel) was significantly decreased. The loss of CFTR channels or changed SUR isoform expression in heart failure possibly impairs channel conductance and increases the risk of cardiac arrhythmias. Furthermore, altered expression of ABC proteins which function as xenobiotic transporters might affect drug delivery into the heart, which is the focus of our current research.

#### Ausgewählte Publikationen / Selected publications

Zolk O, Münzel F, Eschenhagen T (2004) Effects of Chronic Endothelin-1 Stimulation on Cardiac Myocyte Contractile Function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1248-1257

Münzel F, Mühlhäuser U, Zimmermann WH, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Engmann S, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Endothelin-1 and isoprenaline co-stimulation causes contractile failure which is partially reversed by MEK inhibition. *Cardiovasc Res* 68: 464-474

Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* 66: 33-34

Zolk O, Engmann S, Münzel F, Krajcik R (2005) Chronic cardiotrophin-1 stimulation impairs contractile function in reconstituted heart tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1214-1221

Solbach TF, König J, Fromm MF, Zolk O (2006) ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 16: 7-15

**Anhang / Appendix****Begutachtete Drittmittel / Appraised extramural funding**

2004: 117.044 €      2005: 158.372 €      2006: 282.859 €

**Andere Drittmittel / Other extramural funding**

2004: 23.606 €      2006: 60.320 €

**Dissertationen / Doctorate theses**

Haas, P. (Dr. rer. nat.): Charakterisierung des  $\alpha$ -1-adrenergen positiv inotropen Effekts im menschlichen Herzen (2004)

Heide, R. (Dr. med.): Auswirkungen des CYP2D6-Genpolymorphismus auf die Metoprolol-Arzneistoffkonzentration und den metabolischen Quotienten bei Dauertherapie (2004)

Mühlhäuser, U. (Dr. rer. nat.): Einfluss von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren auf die kontraktile Funktion und die beta-adrenerge Signalkaskade von Kardiomyozyten (2004)

Wiechert, S. (Dr. rer. nat.): Adenoviraler Gentransfer in Herzen neonataler Ratten – ein neues Assaysystem zur Targetvalidierung (2004)

Bachmakov, I. (Dr. med.): Propafenon und seine Metabolite als Substrate und Inhibitoren von P-Glykoprotein (2005)

Sarikas, A. (Dr. med.): Untersuchung molekularer Pathomechanismen der hypertrophischen Kardiomyopathie infolge C-terminal trunkierter Mutanten des kardialen Myosinbindungsprotein C (MyBP-C) (2006)

**Mitgliedschaften und Mitarbeit in Berufsverbänden und wissenschaftlichen Kommissionen / Memberships and activities in professional societies and scientific committees**

Prof. Dr. M. F. Fromm

Stellvertretendes Mitglied im Sachverständigen-Ausschuss für Verschreibungspflicht des Bundesministeriums für Gesundheit

Stellvertretender Vorsitzender der Gesellschaft für Klinische Pharmakologie in der DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie)

Editor, Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (seit 2005)

Editorial Board, International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics

Editorial Board, Clinical Pharmacology and Therapeutics (seit 2005)

**Forschungsrelevante Großgeräte / Research equipment**

Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 4000 (2006)

