



**UNI
GRAZ**



**Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Institute of Pharmaceutical Sciences**

Workshop

PhaWi Graz

**Fortschritte in der
Arzneimittelforschung**

**Institut für Pharmazeutische
Wissenschaften
der Karl-Franzens-Universität Graz**

17. – 18. Dezember 2007



Einladung zum Workshop ***PhaWi Graz - Fortschritte in der Arzneimittelforschung***

Die Initiative *PhaWi Graz* hat das Ziel, Arbeitsgruppen der Karl-Franzens-Universität, der Medizinischen Universität und der Technischen Universität Graz, die sich mit Themen der Arzneimittelforschung beschäftigen, enger zusammenzuführen und in einer gemeinsamen Plattform zu vernetzen.

Dazu hat vor einem Jahr ein erster Workshop stattgefunden, bei dem die Arbeitsgruppenleiter eingeladen waren, ihre Forschungsgebiete zu präsentieren. Nun soll diese Initiative in der Weise fortgesetzt werden, dass jungen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, die sich in der Dissertations- oder Habilitationsphase befinden, die Gelegenheit geboten wird, sich und ihr Arbeitsgebiet in Form von Kurzvorträgen zu präsentieren. Der Workshop findet daher auch als Veranstaltung der Doktoratsschule Pharmazeutische Wissenschaften statt.

Ziel ist es, den wissenschaftlichen Dialog innerhalb des Faches zu fördern und auch Bereiche außerhalb der Pharmazie mit einzubeziehen, um fachübergreifende Kooperationen zu fördern. Es sind daher alle am Standort Graz tätigen Arbeitsgruppen, die sich mit entsprechenden Themen beschäftigen, herzlich eingeladen, sich zu beteiligen. Zusätzlich finden auch drei Vorträge zu methodischen Themen von auswärtigen Experten statt.

In einer Abschlussdiskussion sollen auch die Möglichkeiten einer gemeinsamen Kompetenzplattform diskutiert werden.

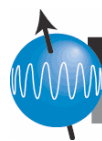
Bei den Firmen Applied Biosystems, Bruker BioSpin GmbH, und Dionex Corporation möchten wir uns herzlich für die finanzielle Unterstützung des Workshops bedanken.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Bauer'.

Univ.-Prof. Dr. Rudolf Bauer
Leiter des Instituts für
Pharmazeutische Wissenschaften

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'A. Zimmer'.

Univ.-Prof. Dr. Andreas Zimmer
Leiter der Doktoratsschule
Pharmazeutische Wissenschaften



Programm



Montag, 17. Dezember 2007

- 13:00 Begrüßung
Rudolf Bauer, Andreas Zimmer
- 13:10 Manfred Spraul, Hartmut Schäfer, Birk Schütz and Ulrich Braumann
Bruker BioSpin GmbH
New Tools for NMR based Metabolomics and Pharmaceutical Research
- 14:10 Zora Saad, Klaus Groschner
Analysis of expression and function of TRP channels in atrial myocardium
- 14:30 Michael Poteser, Ameli Trantina-Yates, Heinrich Mächler, Annarita Graziani, Martin Krenn, Petra Eder, Klaus Groschner
Beitrag von TRPC3 zu PLC-induzierten Ca²⁺-Signalen in somatischen endothelialen Vorläuferzellen
- 14:50 Matteo Beretta, Bernd Mayer
Bioactivation of nitroglycerin by aldehyde dehydrogenases
- 15:10 Kaffeepause
- 15:30 Martina Mitrovic, Peter Holzer
Enhanced Activation of spinal neurons after intracolonic Application of Mustard oil in MICE with colitis
- 15:50 Sandra Gusenleitner, Wolfgang Schühly, Astrid Schrammel-Gorren, Bernd Mayer, Rudolf Bauer
The impact of sesquiterpene lactones on the expression of NFκB1 and inflammatory genes controlled by NFκB
- 16:10 Birgit Steiner-Zitzenbacher
Wissenschaftliches Arbeiten im Gebiet pharmazeutische Informatik – klinische Pharmazie
- 16:30 Thomas Halama, Applied Biosystems
miRNA analys and detection methods as a practical example for a qRT-PCR based workflow in Gene Expression Profiling
- 19:00 Steirisches Buffet im Gasthaus Griesbauer
Schaftal 32, 8044 Graz



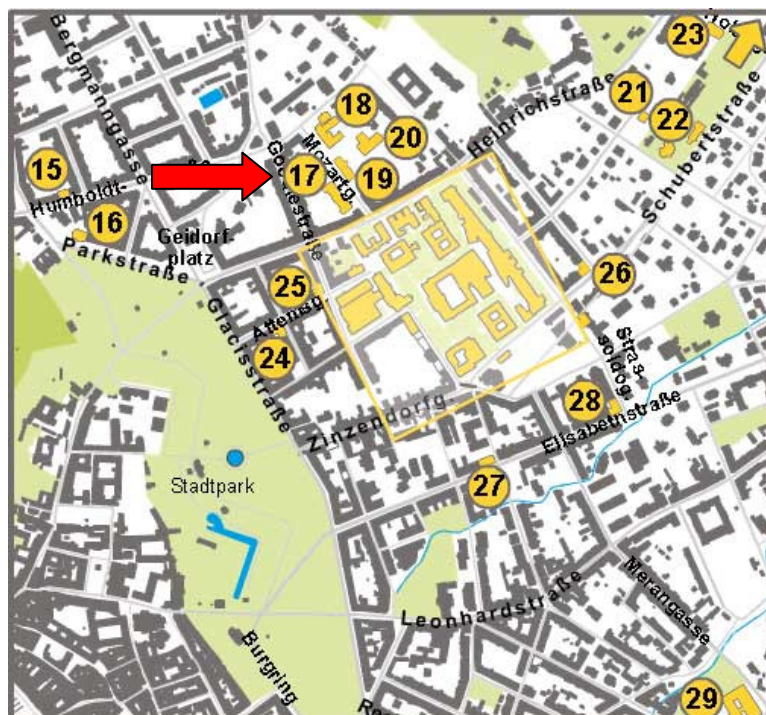
Dienstag, 18. Dezember 2007

- 8:30 Spomenka Milak, Andreas Zimmer
Encapsulation of peptide/protein into solid lipid particles
- 8:50 Andrea Mayer, Eleonore Fröhlich, Reinhold Wintersteiger
Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur Charakterisierung der Toxizität von Nanopartikeln
- 9:10 Claire Jeanquartier, Gerburg Schider, Heidrun Gruber-Wölfler, Sabine Feichtenhofer, Helmut Schwab, Hans-Peter Koch, Robert Schennach, Johannes G. Khinast
Heterogene Biokatalyse: Enzyme auf Si(111)
- 9:30 Eva Kalvoda
Determination of the Angle of Repose of granular materials via DEM
- 9:50 Otto Glatter
Nanostructured Emulsions as Potential Delivery Systems for Functional Molecules
- 10:10 Kaffeepause
- 10:30 Joachim Weiss, Dionex Corporation
Nano-HPLC – Grundlagen und Anwendungen im Bereich der Lebenswissenschaften
- 11:30 Heike Hödl, Martin G. Schmid, Gerald Gübitz,
New chiral selectors for enantioseparation in CE
- 11:50 Mittagspause
- 13:00 VR Irmtraud Fischer
Von der Projektidee bis zum Forschungsprojekt an der Universität: Einladung zur Begegnung mit dem Forschungsservice und – management
anschl. Imbiss und Informationsmöglichkeit
- 14:30 Sara Crockett
Bioactive acylphloroglucinol derivatives from Hypericum L. (Clusiaceae): Recent research and future directions
- 14:50 Anita Karner, Toni Spreitzer, Bernd Gesslbauer, Andreas J. Kungl
Isolierung und Identifizierung von bakteriellen Target Proteinen auf humanen Zellen
- 15:10 S. Fabio Falsone, Andreas J. Kungl
Therapeutic targeting of protein folding
- 15:30 Abschlussdiskussion
- 16:00 Ende

Allgemeine Informationen

- Ort** Meerscheinschlössl
Mozartgasse 3
8010 Graz
- Sprache** Die Vorträge werden in Deutsch oder Englisch gehalten.
- Präsentationen** Für die Kurzvorträge sind 15 min Vortragszeit + 5 min Diskussion vorgesehen.

Die Dateien der Powerpointpräsentationen sollten 20 min vor der jeweiligen Session abgegeben werden.
- Abend-
veranstaltung** Am 17.12.07 findet im Gasthaus Griesbauer ein gemeinsames Abendessen (Steirisches Buffet) statt.
Adresse: Schaftal 32, 8044 Graz
Buslinie Stifting / 82, ab LKH, 10 min Fußweg
Die Bildung von Fahrgemeinschaften wird empfohlen.
- Anmeldung** Anmeldungen für die Teilnahme am Workshop sind noch bis 14. Dezember 2007 möglich.
- Auskünfte** Prof. Dr. Rudolf Bauer
Universitätsplatz 4, 8010 Graz
Tel. 0316 / 380-5525; Fax. 0316 / 380-9860
e-mail: pharm.wiss@uni-graz.at



Abstracts



New Tools for NMR based Metabolomics and Pharmaceutical Research

Manfred Spraul, Hartmut Schäfer, Birk Schütz, Ulrich Braumann
Bruker BioSpin GmbH
manfred.spraul@bruker-biospin.de

NMR for long time was considered a tool to solve chemical structures is now rapidly moving into mixture analysis, driven by Metabonomics and Food Quality Control applications. High throughput screening under highly reproducible conditions is needed to fulfil the stringent requirements of statistical data evaluation. Quantification of compounds in a mixture is the other task, which has to be preceded by safe compound identification, which especially in aqueous solution is not straightforward due to the pH- and salt-dependence of chemical shifts. Linking NMR directly to mass spectral screening analysis allows to further enhance the information available, using statistical covariance analysis. A system has been developed, that completely integrates sample preparation with NMR- and LC-MS measurement.

To safely identify new biomarkers, drug metabolites and interesting drug candidates out of natural product mixtures, LC-NMR with the addition of post column SPE and mass spectrometric detection has developed into a very efficient and rapid tool. Hardware and analysis tools needed for all applications introduced are described and several applications are shown.

Analysis of expression and function of TRP channels in atrial myocardium

Zora Saad, Klaus Groschner
Institute of Pharmaceutical Sciences; Pharmacology and Toxicology, University of Graz,
Universitätsplatz 2, 8010 Graz, Austria, zora.saad@edu.uni-graz.at

Recent evidence suggests a pivotal role of TRPC-related cation channels in cardiac physiology and pathophysiology, with TRPC3 and TRPC6 as potential key players in cardiac remodelling and pathogenesis of hypertrophy. It was also shown that stimulation of hypertrophy associated receptors resulted in significant promotion of TRPC3/6 expression within 6-12h. As TRPC also conducts Ca^{2+} , these channels may contribute either to Ca^{2+} -signalling mediated gene expression or excitation-contraction coupling. The latter would implicate changes in shape and/or kinetic of action potentials. We utilized the patch clamp technique to assess possible changes in waveform of the action potential deriving from TRPC up-regulation. To determine the function of TRPC channels in atrial myocytes we adopted the murine HL-1 cell model. In standard culture conditions these cells were found to express both TRPC3 and TRPC6 at low levels along with TRPC1 and typical signalling partners such as NCX1. We established as well a stabile HL-1 cell line that constitutively over expresses YFP-TRPC3 fusion protein as well cells that only transiently over-express the YFP-TRPC3 protein in order to uncover the changes caused by TRPC3. Electrophysiological assessment of TRPC3 over-expressing cells revealed a shortening in the action potential duration. Furthermore Ca^{2+} imaging studies show alternation of cell's Ca^{2+} homeostasis. And finally we confirmed previously reported augmentation of the TRPC3/6 expression by angiotensin-II (1 μM) and endothelin-1 (100 nM) in cardiac myocytes for wild-type HL-1 cell line. Our results demonstrate that alternation of the excitation-contraction coupling due to up regulation TRP channels are possible. And these changes could be involved in the pathogenesis of maladaptive hypertrophy.

Beitrag von TRPC3 zu PLC-induzierten Ca²⁺-Signalen in somatischen endothelialen Vorläuferzellen

Michael Poteser*, Ameli Trantina-Yates[§], Heinrich Mächler[§], Annarita Graziani*, Martin Krenn*, Petra Eder* und Klaus Groschner*

[§]Abt. für Herzchirurgie des LKH-Graz, *Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmakologie und Toxikologie, Karl-Franzens Universität, Universitätsplatz 2, 8010 Graz
michael.poteser@uni-graz.at

Wie seit kurzem bekannt ist findet man in humanem Fettgewebe eine Population an somatischen endothelialen Vorläuferzellen (EPCs). In Kultur bilden diese Zellen kolonieartige Einheiten (CFUs), die durch VEGF (vascular endothelial growth factor) zur Proliferation und Ausbildung von gefäßartigen Strukturen angeregt werden. Wir haben die Expression des TRPC3-Ionenkanals in frisch isolierten EPCs nachweisen können. Die TRPC3-exprimierende Fraktion der Zellen überlappte mit jener, die auch den Stammzell-Oberflächenmarker CD133- und VEGF-Rezeptor-Expression zeigte. Eine Kultur dieser Zellen (CD133+) in Matrigel führte zur Ausbildung von gefäßartigen Strukturen innerhalb von 48 Stunden. Fura-2/Ca²⁺-Experimente zeigten einen verstärkten VEGF-induzierten Ca²⁺-Einstrom in EPCs mit hoher TRPC3 Expression. Transfektion dieser Zellen mit einem funktional dominant negativem Fragment von TRPC3 führte zu einer Reduktion des VEGF induzierten Ca²⁺-Signales. Hieraus ergibt sich eine mögliche Rolle von TRPC3 in VEGF-induzierten Signalwegen von EPCs. TRPC3 könnte einen Angriffspunkt für die selektive Beeinflussung von Vasculogenese und Angiogenese darstellen.

Bioactivation of nitroglycerin by aldehyde dehydrogenases

Matteo Beretta, Bernd Mayer

Institute of Pharmaceutical Sciences - Department of Pharmacology and Toxicology, Karl-Franzens University, Universitaetsplatz 2, 8010 Graz, matteo.beretta@uni-graz.at

Nitroglycerin (GTN) is an important drug used to treat angina pectoris and heart failure since it increases the amount of nitric oxide (NO) or of a NO-related molecule in blood vessel walls, leading to soluble guanylate cyclase (sGC) activation and subsequently to vasorelaxation.

In addition to the classical NAD(P)⁺-dependent dehydrogenase activity, ALDH enzymes exhibit an esterase activity. Moreover, a recent study revealed that ALDH2, the main mitochondrial isoform of the ALDH super-family, shows a reductase activity. Actually, this enzyme bio-activates GTN, yielding 1,2-glycerol dinitrate (1,2-GDN) and nitrite (NO₂⁻).¹ Specifically, ALDH2 generates 1,2-GDN and 1,3-GDN at a ratio of ≈ 8:1 and NAD⁺ is not required as a coenzyme, but it increases GTN metabolism by about 10-fold.

It has been suggested that the loss of ALDH2 activity could account for GTN tolerance, rendering the therapy ineffective.² A possible explanation of GTN tolerance would be the inactivation of ALDH2 due to a disulfide bridge formation in its active site. Thus, reducing molecules are a requirement for continued reductase activity, but so far only non-physiological reductants (like dithiothreitol or 2-mercaptoethanol) were found to be effective.¹

Recently we found that also the main cytosolic isoform (ALDH1) is able to metabolize GTN triggering sGC activation. Moreover we found that both ALDH1 and ALDH2 could activate sGC without the need of other proteins by direct production of NO during GTN metabolism.³ These recent findings will be shown during the presentation.

Bibliography

1. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8306-11.
2. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mülsch A, Schulz E, Keaney JF, Stamler JS, Münzel T. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. J Clin Invest 2004; 113: 482-9.
3. Beretta M, Kollau A, Russwurm M, Koesling D, Keung WM, Schmidt K, Mayer B. Activation of soluble guanylate cyclase in the presence of purified human aldehyde dehydrogenase. Abstract sent for the 3rd International Conference on cGMP – Generators, Effectors and Therapeutic Implications (Dresden, Germany – June 15-17, 2007).

Enhanced Activation of spinal neurons after intracolonic application of mustard oil in MICE with colitis

Martina Mitrovic, Peter Holzer

Research Unit of Translational Neurogastroenterology, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology, Medical University of Graz, Universitätsplatz 4, 8010 Graz
ma.mitrovic@meduni-graz.at

Aims: The gut-brain axis is under the control of primary afferent neurons monitoring the physical and chemical environment in the lumen and wall of the gut. The transient receptor potential of type A1 (TRPA1) is a multimodal sensor that is expressed by primary afferent neurons innervating the colon and may play a role in pain signalling. This study examined whether stimulation of TRPA1 by intracolonic mustard oil (MO) causes afferent input to the spinal cord and whether this effect is changed by mild colitis.

Methods: Female Him:OF1 mice were treated with intracolonic MO (2% in peanut oil). C-Fos expression in the superficial layers of the spinal dorsal horn (laminae I-IIo) at the level of S1 was measured immunocytochemically 1h post-treatment. Morphine (10mg/kg in saline) was administered subcutaneously 1h before the MO stimulus. Mild colitis was induced by adding dextrane sulphate sodium (DSS,36-50kDa,2%) to the drinking water for 1week. The effect of DSS on stool consistency, colon length, colonic myeloperoxidase (MPO), homecage-activity, weight, feeding and drinking was monitored.

Results: Relative to vehicle, MO increased the number of c-Fos-positive cells in laminae I-IIo, the main termination site of visceral afferent neurons, by 77.1% (t-test: $t_{8,784}=4.851, p<.05$). DSS-induced mild colitis was characterized by increased myeloperoxidase (MPO) levels, shortened colon length and loose bloody stool, whereas homecage-activity, body weight, feeding and drinking remained unchanged. Compared to control, the effect of MO to induce spinal c-Fos was enhanced after DSS pretreatment by 41.1% (t-test: $t_{12}=3.387, p<.05$). Morphine reduced the spinal c-Fos response to MO by 43.5% (t-test: $t_{11}=-4.688, p<.05$).

Conclusion: TRPA1 stimulation by intracolonic MO induces afferent input to the spinal cord. This response is exaggerated in mice with mild colitis. This observation and the inhibition of the spinal c-Fos response by morphine reflect the nociceptive nature of MO-induced afferent input.

The impact of sesquiterpene lactones on the expression of NF- κ B and inflammatory genes controlled by NF- κ B

Sandra Gusenleitner¹, Wolfgang Schuehly¹, Astrid Schrammel-Gorren², Bernd Mayer and Rudolf Bauer¹

¹Institute of Pharmaceutical Sciences – Pharmacognosy, Karl-Franzens-University, Universitätsplatz 4/I, 8010 Graz. ²Institute of Pharmaceutical Sciences – Pharmacology and Toxicology, Karl-Franzens-University, Universitätsplatz 2, 8010 Graz.

sandra.gusenleitner@uni-graz.at

Sesquiterpene lactones are secondary plant metabolites which are very widespread in the Asteraceae family: Helenalin from *Arnica montana* L. or parthenolide from *Tanacetum parthenium* L. Schultz-Bip. are just two well known examples.

Since the late 1990's the anti-inflammatory effect of such substances has been linked to a specific inhibition of nuclear factor kappa B (NF κ B). This transcription factor plays a pivotal role in the regulation of immune response and inflammation, as it regulates the expression of many pro-inflammatory genes, like TNF- α , COX-2, IL-1 β or IL-8.

In a recent project we could provide molecular evidence, that sesquiterpene lactones, such as helenalin and parthenolide, target NF κ B by decreasing the mRNA levels as well as the protein expression of NF κ B1, thereby interrupting the classical NF- κ B pathway. Furthermore also the mRNA levels of TNF- α and COX-2 were reduced. For elucidation of structure-activity relationship we determined the ability of 12 different sesquiterpene lactones in the inhibition of expression of NF κ B1.

Wissenschaftliches Arbeiten im Gebiet pharmazeutische Informatik – klinische Pharmazie

Birgit Steiner-Zitzenbacher

Fresenius Kabi Austria GmbH, Development - iv Drugs & Oncology, Kabi Innovation Centre
Hafnerstrasse 36, 8055 Graz

birgit.steiner-zitzenbacher@fresenius-kabi.com

Zielsetzung: Schwerpunktmäßige Darstellung des Themas klinische Pharmazie als Teilbereich einer multimedialen Lern- und Weiterbildungsplattform
Bisherige Arbeit (Stand 12/2007): Erstellung eines Konzeptes/Literaturrecherche zur Aufbereitung des Themas Klinische Pharmazie.

Als Schwerpunkte wurden definiert:

- Enterale Ernährung
- Parenterale Ernährung
- Zytostatikatherapie

Konzept:

1. Klinische Pharmazie/patientenorientierte Pharmazie – eine Definition
2. Grundlagen der Arzneimittelzulassung
3. Pharmakovigilanz
4. Nutzen-Risikobewertung einer Arzneimitteltherapie
5. Arzneimittelinteraktionen
6. Compliance
7. Allgemeine Grundlagen der pharmazeutischen Betreuung
8. Pharmakoepidemiologie und Pharmakoökonomie
9. Parenteralia
10. Parenterale Ernährung
11. Enterale Ernährung
12. Zytostatikatherapie

miRNA analysis and detection methods as a practical example for a qRT-PCR based workflow in Gene Expression Profiling

Thomas Halama

Applied Biosystems

Thomas.Halama@eur.appliedbiosystems.com

The presentation offers an overview of the complete workflow solution by Applied Biosystems – from effective isolation and stabilisation of RNA, over (pre-) amplification and detection methods such as qRT-PCR based screening technology and finally down to statistical data mining approaches. miRNA related research tools will serve as a practical example to demonstrate Applied Biosystems' portfolio of dedicated reagents, instruments and software that supports Genexpression Profiling efforts in all research areas.

Encapsulation of peptide/protein into solid lipid particles

Spomenka Milak¹, Andreas Zimmer²,

¹ PLIVA d.d. Prilaz baruna Filipovića 29, 10000 Zagreb, Croatia, Spomenka.Milak@pliva.hr

² Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmazeutische Technologie, Karl-Franzens-Universität, Schubertstr. 6, 8010 Graz

Encapsulation of peptide/protein into solid lipid particles will be used as the approach aimed at improving peptide/protein duration time in the body. Lipids will be primarily used as the matrix material as they have the potential as biocompatible and biodegradable carriers for peptides and proteins.

Encapsulation of peptide/protein into solid lipid particles prepared by different types of multiple emulsions will be used as the approach to stabilize peptide/protein. To achieve the protein stabilization, the optimization of parameters/conditions during particles preparation, storage and release will be performed and mechanism of stabilization will be investigated. Furthermore, an attempt will be done to improve the stability of peptide/protein by means of other excipients and to explain the mechanism of stabilization.

The characterization of particulate system will include: particle size distribution, surface appearance (SEM), thermal events (DSC), drug content, in-vitro release studies, adsorption assessment of peptide/protein to lipid, biocompatibility studies, protein distribution in particles, in-vitro stability studies, bioactivity of peptide/proteins, protein integrity inside particles by mass spectrometry.

The purpose of research is to investigate a stable parenteral controlled release particulate system for peptide/proteins.

Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur Charakterisierung der Toxizität von Nanopartikeln

Andrea Mayer, Eleonore Fröhlich, Reinhold Wintersteiger

Medical University, Center for Medical Research, Stiftingtalstraße 24, 8010 Graz
a.mayer@meduni-graz.at

Bisher existieren keine Richtlinien, welche die Verwendung von Nanopartikeln im medizinischen Bereich regeln.

Ziel unseres Projektes ist es ein Testsystem zu entwickeln mit dem die Hämokompatibilität von Nanopartikeln festgestellt und mögliche toxische Effekte abgeschätzt werden können.

Das Testsystem wird aus vier Komponenten bestehen, mit welchen die mögliche Hämolyse, Entzündungsauslösung, Gerinnungsinduktion und Komplementaktivierung durch Nanopartikel getestet werden kann.

Die Methodenetablierung der Hämolysetestung wurde mit Hypochloriger Säure in einem Konzentrationsbereich von 800-3200 μM durchgeführt, wobei das freigesetzte Hämoglobin im Überstand mit einem Photometer bei 540 nm detektiert wird.

Validiert wurde die Methode mit Quarzpartikel, wobei prozentuelle Hämolysewerte im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte erzielt wurden.

Die zweite Analyseverfahren ist die Thrombozytenaktivitätsmessung am FACS. Mit Hilfe zweier Fluoreszenzmarker werden nicht aktivierte und durch ADP (20 μM) aktivierte Thrombozyten angefärbt und danach am FACS vermessen. CD 42b (Phycoerythrin markiert) stellt dabei den Oberflächenmarker für die gesamte Population dar, hingegen CD 62P (Alexa Fluor 488 markiert) jenen für aktivierte Thrombozyten.

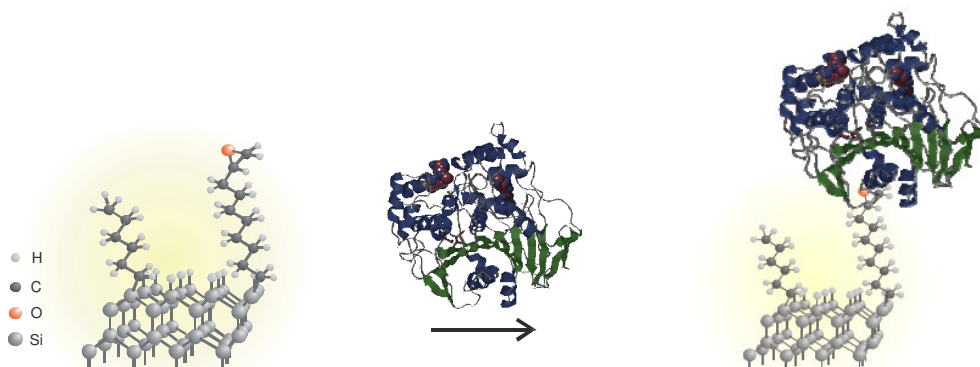
Die dritte bereits etablierte Methode ist ein Enzym Immuno Assay zur Bestimmung der Komplementaktivierung. Etabliert wurde diese Methode mit Amidin-Polystyrenpartikeln in der Größe von 220 nm. Die durch Stimulation mit den genannten Partikeln gebildete Menge an C3a, wird durch Vermessung mit dem Photometer und Auswertung anhand einer Eichkurve, quantifiziert.

In weiteren Versuchen wird die Methode der Leukozytenaktivierungsmessung am FACS zur Vervollständigung unseres Testsystems etabliert, um wichtige Informationen über biologische Effekte und Toxizität der Partikel, für zukünftige *in vivo* Applikationen, zu gewinnen.

Heterogene Biokatalyse: Enzyme auf Si(111)

Claire Jeanquartier, Gerburg Schider, Heidrun Gruber-Wölfler, Sabine Feichtenhofer**, Helmut Schwab**, Hans-Peter Koch⁺, Robert Schennach⁺, Johannes G. Khinast
Institut für Ressourcenschonende und Nachhaltige Systeme, TU Graz, Inffeldgasse 21A/II, A-8010 Graz, **Institut für Molekulare Biotechnologie und ⁺Institut für Festkörperphysik

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Immobilisierung von katalytisch aktiven Substanzen auf Silizium-Oberflächen zur Herstellung von heterogenen (Bio)Katalysatoren. Im ersten Schritt werden mittels UV-induzierter Hydrosilylierung organische Moleküle mit einer terminalen C-C Doppelbindung kovalent an die Si-Oberfläche gebunden. Diese Immobilisierungsmethode benötigt weder Chemikalien noch Katalysatoren, wodurch eine Verunreinigung der Oberfläche vermieden werden kann. Die immobilisierten organischen Moleküle besitzen funktionelle Gruppen, die mit den Aminogruppen von Enzymen reagieren können und dadurch die Bindung der Enzyme an die Oberfläche ermöglichen. Die funktionalisierten Oberflächen wurden anschließend mittels Infrarot-Spektroskopie analysiert. Die Aktivität des immobilisierten Enzyms wurde mit Hilfe eines einfachen photometrischen Assays analysiert. Die Untersuchungen zeigen, dass immobilisierte Esterase B katalytisch aktiv bleibt und eine gute Langzeitstabilität aufweist. Anwendungsbereiche dieser chemisch milden und effizienten Methode sind die heterogene (Bio)Katalyse zur Herstellung chiraler pharmazeutischer Wirkstoffe, Halbleiter-Industrie und Bio-Sensorik. Weiters kann mittels einer Lithographiemaske eine laterale Strukturierung der Silizium-Oberflächen durchgeführt werden und erlaubt so die strukturierte Immobilisierung von anderen katalytisch aktiven Molekülen, wie beispielsweise enantioselektive, organometallischen Verbindungen (Metallocenen). Mit Hilfe dieser Methode können unter kontrollierten Bedingungen multifunktionelle Katalysatoren hergestellt werden.



Determination of the Angle of Repose of granular materials via DEM

Eva Kalvoda
Institut für ressourcenschonende und nachhaltige Systeme (RNS), TU-Graz,
Inffeldgasse 21a, 8010 Graz
eva.kalvoda@student.tugraz.at

In the pharmaceutical industry granular materials play an important role, for example in mixing and granulation processes, fluidized beds or tablet compression. However, the behaviour of granular materials is not fully understood until now. In mixing processes for example it is difficult to predict if two powders will mix or segregate, and also how fast they mix. Therefore processes are often designed by trial and error and not by calculation. Simulations of granular flows can lead to a better understanding, because they give an insight into how particles interact. The Discrete Element Method (DEM) is a particle simulation method that simulates granular flows by modelling the forces between the particles. An application of DEM is the simulation of the angle of repose of granular materials, which is an indication for the cohesiveness of the particles. With these results it is possible to model realistic heaps, which is also important for the modelling of bladed granular mixers, as the granular material in the mixer forms heaps above the blades.

Nanostructured Emulsions as Potential Delivery Systems for Functional Molecules

Otto Glatter

Department of Chemistry, University of Graz, 8010 Graz, Austria

otto.glatter@uni-graz.at

In this contribution we present our latest results on hierarchically organized fluid particles, i.e., sub-micron sized droplets kinetically stabilized as an aqueous emulsion having a self-assembled nanostructured interior.

Most interestingly, these particles allow us to study transfer of lipidic phases or of other molecules inserted to the interior of the droplets. After mixing two solutions with different loadings, one can measure the kinetics of transfer and equilibration if the internal structure depends on the solubilized materials. So it is possible to study mixtures with different loading fractions of oil, mixtures with different oils, dependence of kinetics on the concentration of secondary emulsifier etc.

Small angle X-ray scattering (SAXS), cryogenic transmission electron microscopy (Cryo-TEM), and dynamic light scattering allow the internally self-assembled particles to be investigated in detail. A short description of an improved laboratory SAXS apparatus will be given. It allows fast experiments, i.e. time series with less than one minute per single experiment.

So such hierarchically organized systems offer a unique possibility to study transfer between sub-micron sized confinements embedded in a continuous outer phase. In addition, these particles are potential candidates for carrier systems for functional molecules. These molecules can be lipophilic, amphiphilic or hydrophilic. Possible applications range from pharmaceutical and cosmetic applications, via food systems to plant protection systems.

Nano-HPLC – Grundlagen und Anwendungen im Bereich der Lebenswissenschaften

Joachim Weiss

Dionex Corporation, International Operations, Am Wörtzgarten 10, D-65510 Idstein

joachim.weiss@dionex.com

Die Miniaturisierung in der HPLC unter Verwendung von Trennsäulen mit Innendurchmessern von 75-300 μm wird bereits seit 20 Jahren vorangetrieben, fand aber bisher nur wenig Beachtung in der pharmazeutischen Industrie. Diese Situation hat sich jedoch in den letzten Jahren grundlegend gewandelt. Die wohl wichtigste Triebkraft für die zunehmende Verbreitung der Nano-HPLC stellt die Entwicklung von LC-MS-Techniken in den Lebenswissenschaften dar. Die geringe Flussrate von 0,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ ermöglicht die splitlose Kopplung der Nano-HPLC mit Massenspektrometern, was eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung zur Folge hat. Im Vergleich zur konventionellen HPLC-MS mit Trennsäulen von 4,6 mm Innendurchmesser und Flussraten von 1 mL/min beispielsweise kann die Empfindlichkeit um den Faktor 3800 gesteigert werden. Im ersten Teil dieser Präsentation werden die Grundlagen und Vorteile der Nano-HPLC sowie wichtige Aspekte der Instrumentierung diskutiert. Systeme für die Probenaufgabe, Eluensförderung und Detektion müssen an die geringen Flussraten der miniaturisierten HPLC angepasst werden. Im zweiten Teil dieser Präsentation werden Anwendungen der Nano-HPLC in den Lebenswissenschaften vorgestellt. Anwendungen der Nano-LC-MS im Bereich Proteomics stehen hierbei im Vordergrund, da diese zu den erfolgreichsten Anwendungen der miniaturisierten HPLC überhaupt gehören. Die Massenspektrometrie hat die chemische Sequenzierung zur Identifikation von Proteinen bei unterschiedlicher Expression fast vollständig verdrängt. Aufgrund der extrem kleinen Probenvolumina, die für die Sequenzierung über HPLC-MS zur Verfügung stehen, gibt es praktisch keine Alternative zur Nano-LC, um die erforderliche Empfindlichkeit zu erzielen. Im Rahmen dieser Präsentation wird gezeigt, dass eine Vielzahl von HPLC-Applikationen an miniaturisierten Trennsäulen – heutzutage vornehmlich an monolithischen Phasen – durchgeführt werden können, mit den Vorteilen höherer Empfindlichkeit und einfacher Kopplung an ein Massenspektrometer.

New chiral selectors for enantioseparation in CE

Heike Hödl, Martin G. Schmid, Gerald Gübitz,
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmazeutische Chemie, Karl-Franzens-Universität, Universitätsplatz 1, 8010 Graz

The development of chiral separation methods is of great interest since it is well established that in many cases of drugs only one enantiomer produces the desired therapeutic effect (eutomer). The other enantiomer (distomer) may be inactive, can produce unwanted side effects or can even be toxic. It has to be metabolized as well and represents an unnecessary burden for the organism.

In the last decades HPLC was the most commonly used method for enantioseparation, but in recent years CE turned out to be a powerful alternative.

Proteins have been shown to be effective chiral selectors for enantioseparation in CE. One part of this work deals with the application of bovine serum albumine (BSA) and canine serum albumine (CSA) for enantioseparation of tryptophan derivatives. L-Tryptophan represents an essential amino acid and finds application as an antidepressant agent, while D-tryptophan may show side effects. Therefore the development of chiral separation methods for enantioseparation to detect small amounts of D-tryptophan as impurity in samples of L-tryptophan is of great importance.

The other part describes the application of the chiral ligand-exchange principle in CE. Copper(II) complexes of L-tartaric acid or L-threonine as selectors for the chiral separation of drugs containing amino alcohol structure (sympathomimetics and β -blockers) were used. In the case of β -blockers the S-(-)-enantiomers show a 50 to 500 fold activity compared to the R-(+)-enantiomers, whereas with the sympathomimetics the R-(-)-enantiomers are the more active ones.

Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum L.* (Clusiaceae): Recent research and future directions

Sara L. Crockett

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmakognosie, Karl-Franzens-Universität, Universitätsplatz 4, 8010 Graz

The Lise-Meitner-Program, funded by the Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF), provides a unique opportunity for foreign researchers to conduct innovative research in Austria, encouraging collaborations between Austria and other countries. During research conducted from 2004-2006, extracts and purified compounds isolated from selected flowering plant species of *Hypericum L.* (St. John's Wort; Clusiaceae) were tested against pathogenic microorganisms affecting both humans and bees. A specific class of compounds, phloroglucinol derivatives, was focused upon due to their unique structures and known antibacterial, antifungal, anti-viral, anti-malarial, anti-inflammatory, and anti-depressant activities. Several new compounds with interesting bioactivities were discovered.

These findings, as well as new research goals regarding phytochemical and genetic diversity within *Hypericum*, provided the basis of a recently funded Hertha-Firnberg Proposal (start date: November 2007). The Hertha-Firnberg Program (FWF) provides an additional opportunity for young women researchers to progress toward their goal of academic Habilitation. Here, findings of the previously-funded project, goals of the currently-funded project, and future directions are described.

Isolierung und Identifizierung von bakteriellen Target Proteinen auf humanen Zellen

Anita Karner, Toni Spreitzer, Bernd Gesslbauer, Andreas J. Kungl

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmazeutische Chemie, Karl Franzens Universität, Universitätsplatz 1, 8010 Graz

Langfristiges Ziel dieses Projektes ist es, einen Impfstoff gegen die häufig bei Kindern auftretende Mittelohrentzündung zu entwickeln. Diese Krankheit wird durch drei Bakterienspezies, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* hervorgerufen. Weltweit erkranken jedes Jahr mehrere Millionen Kinder an Otitis media. Schwere Formen der Erkrankung können zu Hörverlust, und bleibenden Gehörschäden führen. Ein schützender Impfstoff gegen Mittelohrentzündung ist noch nicht erhältlich. Die Behandlung der Krankheit erfolgt meist mit Antibiotika und ist aufgrund der großen Anzahl von Serotypen und der steigenden Antibiotikaresistenz oft nur eingeschränkt möglich.

Im Rahmen des OMVac EU-Projekts (Koordination: Intercell AG) sollen systematisch Proteine für die Entwicklung von Impfstoffen gegen und diagnostischen Markern für Otitis media identifiziert werden. Dazu werden Technologien wie Proteomics, Massenspektrometrie sowie genomische Bibliotheken zur Antigenidentifizierung eingesetzt und Studien zur Beobachtung der menschlichen Immunantwort durchgeführt.

In unserem Beitrag zu diesem Verbundprojekt geht es nun darum, humane Membranproteine zu identifizieren, welche die pathogenen Mikroorganismen als Targets für die Infektion nutzen. Zu diesem Zwecke wurden Methoden entwickelt, um aus adhärenenten, menschlichen Zellen Membranproteine zu präparieren. Es ist uns weiters gelungen, die lipophilen und schwer löslichen Membranproteine aus der Cytoplasmamembran zu isolieren und mittels LC-MS/MS zu analysieren, wodurch schon einige vielversprechende Kandidaten identifiziert werden konnten.

Therapeutic targeting of protein folding

S. Fabio Falsone, Andreas J. Kungl

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmazeutische Chemie, Karl-Franzens-Universität, Universitätsplatz 1, 8010 Graz

The functional, three-dimensional structure of a protein is indispensable for cellular life. Within the cell, correct protein folding and stabilisation is supervised by a “folding machinery”, consisting of a set of proteins called molecular chaperones. Usually, proteins evading folding control display a deleterious function and are responsible for many severe diseases, ranging from cancer to neurodegeneration.

Given the peculiar significance of molecular chaperones as decisional switches between protein folding and degradation, these molecules are emerging to be appealing pharmaceutical targets for triggering the disposal of incorrectly folded proteins. In particular, the inhibition of the molecular chaperone Heat Shock Protein 90 (Hsp90) by benzoquinone ansamycins constitutes a very powerful approach to face diseases evolving from misfolded polypeptides. This is actually boosting the development and clinical validation of a novel class of Hsp90-inhibiting drugs.

To improve the research and development of novel Hsp90-targeting drugs, it is essential to focus on cellular, mechanistic and structural properties of Hsp90. The present talk summarises our efforts of combining “traditional” biophysical in vitro and cell biological techniques with “unconventional” proteomics protocols to obtain a global picture of the “social life” of Hsp90 within the “protein community” of a cell. By this means, we intend to highlight protein interaction clusters with a pronounced susceptibility to Hsp90-inhibition, envisioning the disclosure of novel disease-related protein pathways potentially “druggable” by Hsp90-inhibitors. Also, this approach should represent a method for surveying undesirable side-effects of Hsp90-targeting drugs at cellular level.

An das
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Universitätsplatz 4
8010 Graz
Per Fax: 0316-380 9860
e-mail: pharm.wiss@uni-graz.at

Anmeldung zum Workshop
PhaWi Graz
Fortschritte in der Arzneimittelforschung
des
Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften
der Karl-Franzens-Universität Graz
17. – 18. Dezember 2007

Name _____ Titel _____

Vorname _____

Firma/Institut _____

Abteilung _____

Adresse _____

Tel. _____

Fax _____

E-Mail _____

- Ich werde am *PhaWi Graz* Workshop teilnehmen
- Ich werde am Abendessen am 17.12.2007 teilnehmen.

.....
Ort/Datum _____ Unterschrift _____

Anmeldungen für Teilnahme bitte bis **14. Dezember 2007**.