

Kalorimetrische Methoden in der Untersuchung von Modellmembranen

- DSC : differential scanning calorimetry
- ITC : isothermal titration calorimetry

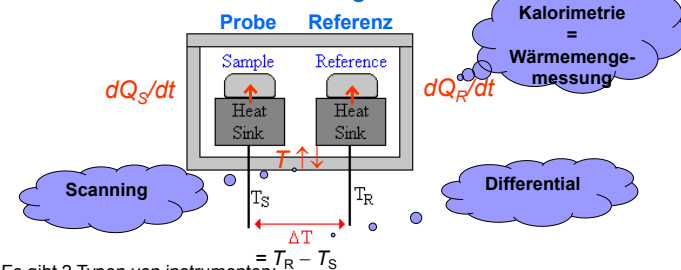
1

DSC : differential scanning calorimetry Differential Scanning Kalorimetrie



2

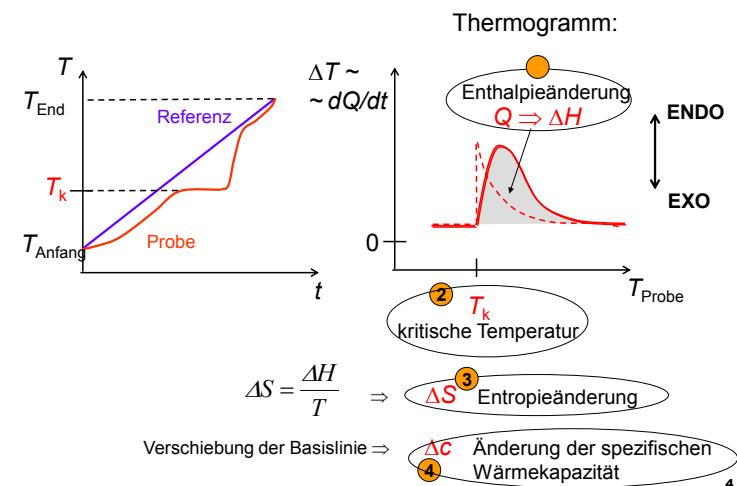
DSC: differential scanning calorimetry Differential Scanning Kalorimetrie



Es gibt 2 Typen von instrumenten:

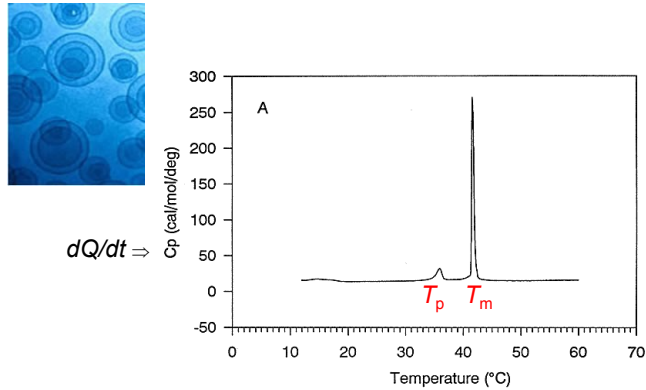
- 1 ΔT wird gemessen \Rightarrow Heizung wird reguliert so, dass, $\Delta T = 0$
 $\Rightarrow dQ_S/dt - dQ_R/dt = dQ/dt$ wird gemessen und dargestellt
- 2 ΔT wird gemessen $\Rightarrow dQ/dt$ wird kalkuliert und dargestellt

3

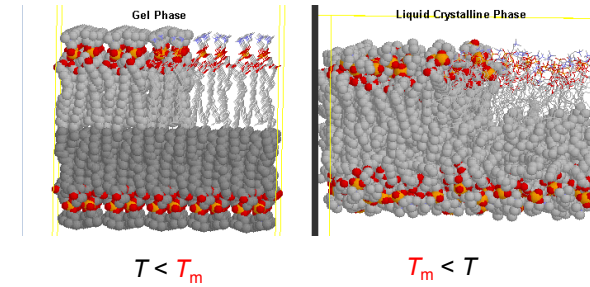


4

Beispiel: DPPC multilamellares Liposom



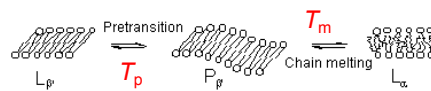
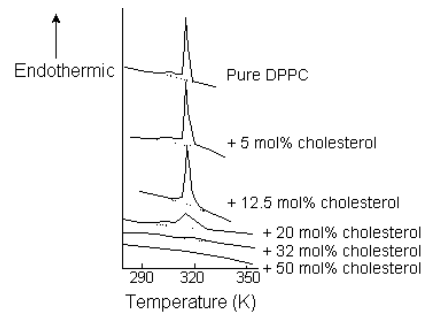
5



6

Beispiel:

Wirkung von Cholesterol auf DPPC-Liposom



7

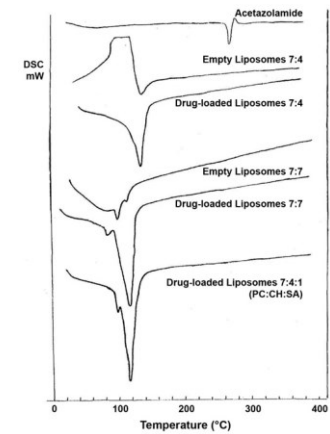
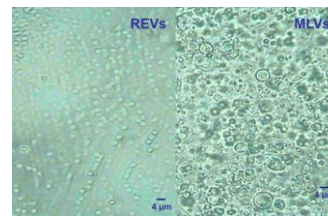
Beispiel: Acetazolamid-Formulierung

Acetazolamid wird für die Senkung des Innendruckes in dem Auge bei Glaukom verwendet.

Nebenwirkungen: Depression, Niereninsuffizienz, Erbrechen, Anorexie, ...
Kontraindikationen der lokalen Anwendung: schlechte Wasserlöslichkeit, kleiner Permeabilitätskoeffizient

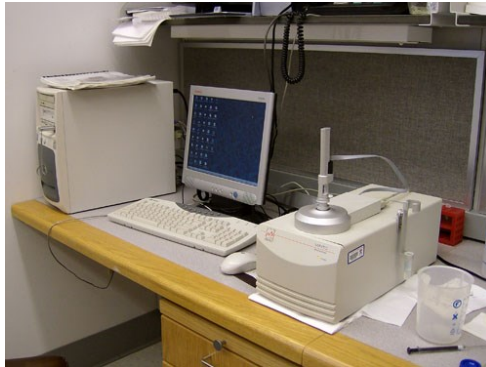
➔ Liposom

AAPS PharmSciTech 2007; 8 (1)



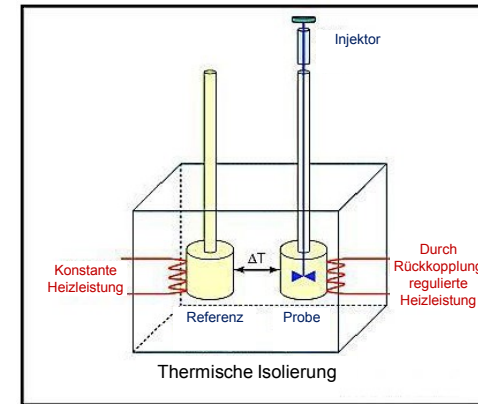
8

ITC: isotherm titration calorimetry Isotherme Titrationskalorimetrie



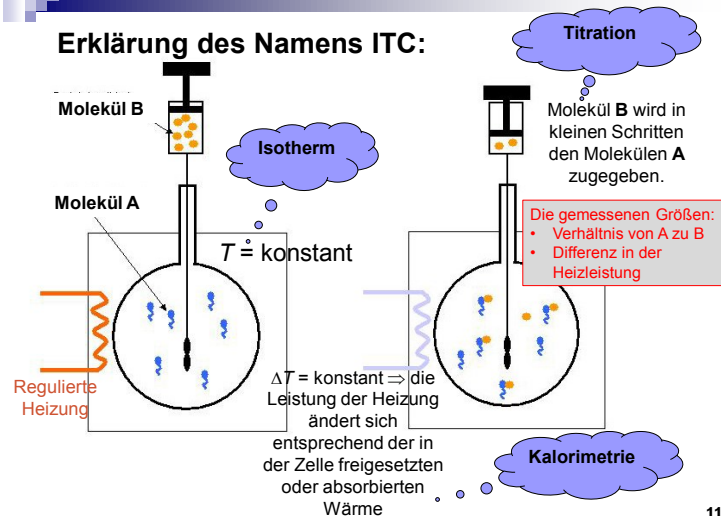
9

Aufbau:

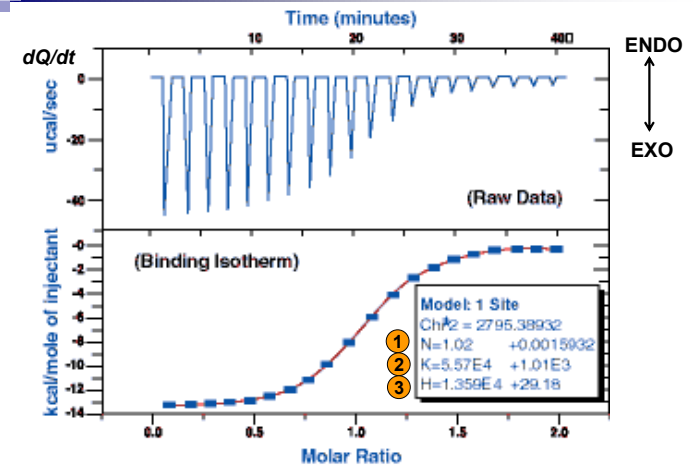


10

Erklärung des Namens ITC:

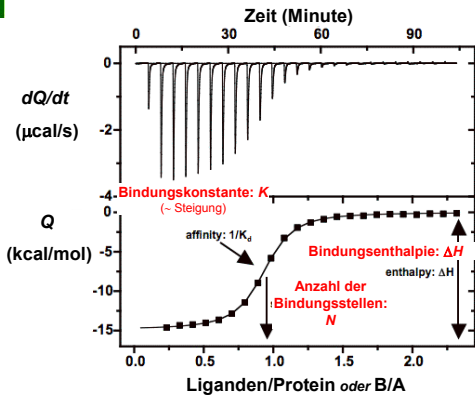


11



① Anzahl der Bindungsstellen ② Bindungskonstante ③ Bindungsenthalpie

12



13

Die Größen, die aus einer ITC Messung bestimmt werden können: N , K , ΔH +

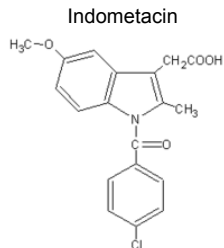
$$\left. \begin{aligned} \Delta G &= -RT \ln K \\ \Delta G &= \Delta H - T \cdot \Delta S \end{aligned} \right\} \text{④ } \Delta S \text{ Bindungsentropie}$$

Beispiele für medizinische/biologische Anwendungen:

- ✦ Protein-Protein Wechselwirkung
- ✦ Protein-Liganden Wechselwirkung
- ✦ Enzyme-Substrat Bindung
- ✦ Enzyme-Inhibitor Bindung
- ✦ Lipid-Lipid Wechselwirkung
- ✦ Protein-Lipid Wechselwirkung
- ✦ Nukleinsäure-Protein Wechselwirkung
- ✦ Nukleinsäure-Membran Wechselwirkung
- ✦ Oligomerisation/Dissoziation
- ✦ Myzellenbildung
- ✦ Wirkstoff-Lipid/Protein Wechselwirkung
- ✦ Wirkstoff-Surfactant Wechselwirkung

14

Beispiel: Wechselwirkung von Antiphlogistika mit Liposomen



Indometacin zählt zu den nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAID) und wirkt schmerzlindernd, entzündungshemmend und fiebersenkend.

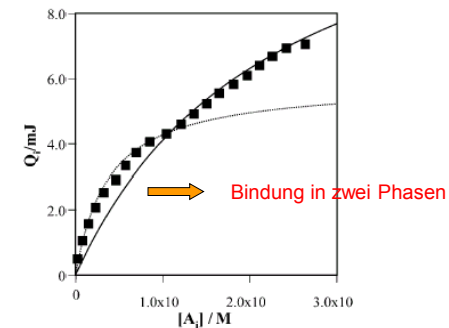
Es hemmt die Bildung bestimmter Gewebshormone (Prostaglandine), die bei Schmerz- und Entzündungsreaktionen des Körpers eine wichtige Rolle spielen. Die fiebersenkende Wirkung kommt durch eine Beeinflussung des Temperaturregelzentrums im Gehirn zu Stande. Zudem hat Indometacin einen hemmenden Einfluss auf die Blutgerinnung.

Nebenwirkungen: Magen-Darm-Störungen, Druckgefühl in der Magengegend, Durchfall, Magenblutung

➡ Liposomformulierung

15

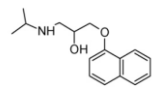
Beispiel: Wechselwirkung von Antiphlogistika mit Liposomen



Biophysical Journal Volume 86 February 2004 946-954
Interaction of Antiinflammatory Drugs with EPC Liposomes:
Calorimetric Study in a Broad Concentration Range

16

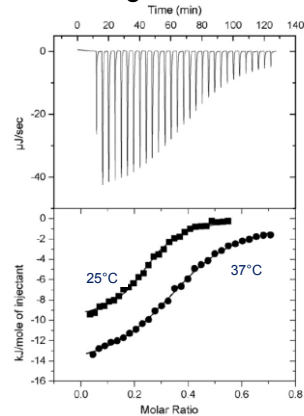
Beispiel: Wechselwirkung von Betablockern mit Liposomen



Propranolol

+

Liposom: POPC+POPG



Es wurde untersucht:

- Rolle der Konzentration
- Rolle der Ionen
- Rolle der Temperatur
- Rolle der Liposomgröße



Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 78 (2010) 275–282

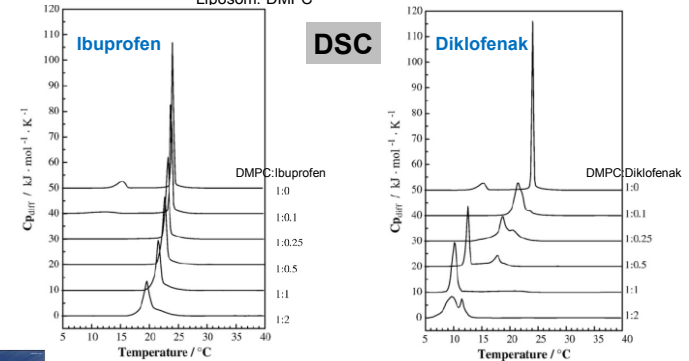
Microcalorimetric and zeta potential study on binding of drugs on liposomes

17

Beispiel: Wirkung von nicht-steroidalen Antiphlogistika auf die Zellmembran

Antiphlogistika: Ibuprofen, Diklofenak, Naproxen

Liposom: DMPC



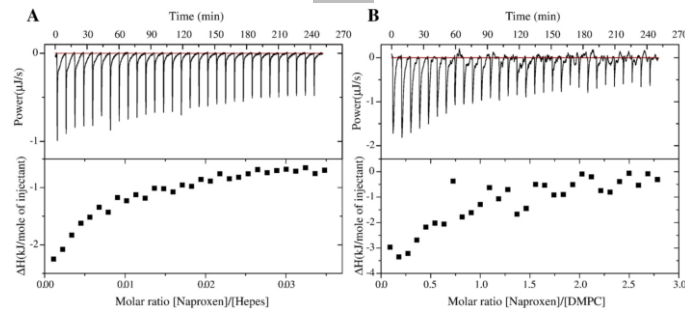
Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 1296–1303

The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids

Wirkung

18

ITC



Keine Wechselwirkung

Fluoreszenzspektroskopie

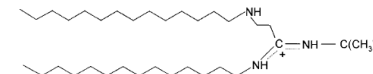
19

Beispiel: Wechselwirkung zwischen DNA und Liposomen

DNA Transfer → Liposom

Vorteile: eine schwächere Immunantwort, ein großes „Größenangebot“, zellspezifische Liposomen

Liposom: diC₁₄-Amidin



+ Plasmid-DNA

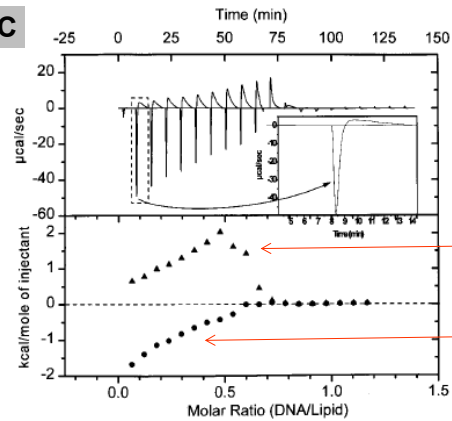
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 2000 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 275, No. 38, Issue of September 22, pp. 29533–29538, 2000
Printed in U.S.A.

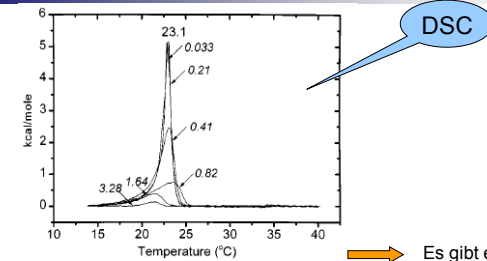
Biophysical and Structural Properties of DNA-diC₁₄-amidinium Complexes

20

ITC



21



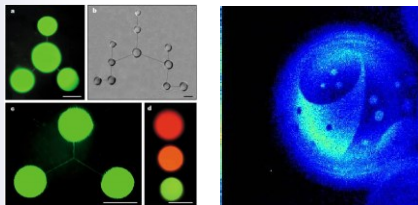
Es gibt eine Strukturänderung.

Was ist diese Änderung?

Fluoreszenzspektroskopie

22

Fluoreszenzspektroskopie in der Untersuchung von Modellmembranen



23

Fluoreszenz

Fluoreszenz → Lumineszenz

Lumineszenz: Strahlung eines Körpers im Überschuss zur Temperaturstrahlung

Beobachtungen:

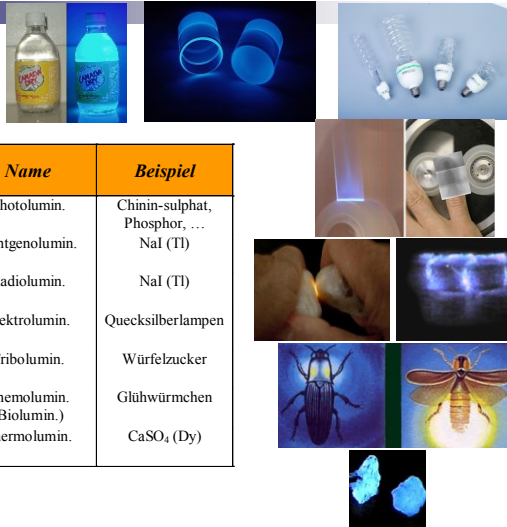
- hängt praktisch nicht von der Temperatur des Körpers ab → „kaltes Licht“
- Linien- oder Bandenspektrum → Elektronenübergänge



24

Nach der
Anregungsart:

Art der Anregung	Name	Beispiel
Licht	Photolumin.	Chinin-sulphat, Phosphor, ...
Röntgenstr.	Röntgenolumin.	NaI (Tl)
radioaktive Str.	Radiolumin.	NaI (Tl)
elektrisches Feld	Elektrolumin.	Quecksilberlampen
mechanische Wirkung	Tribolumin.	Würfelzucker
chemische Reaktion	Chemolumin. (Biolumin.)	Glühwürmchen
Wärme	Thermolumin.	CaSO ₄ (Dy)



25

Mechanismus der Lumineszenz

Atom: $E = E_{el}$

Linienpektrum
(Z.B. Na)

Molekül: $E = E_{el} + E_v (+ E_r)$

Linien/Bandenspektrum
(Z.B. Fluorescein)

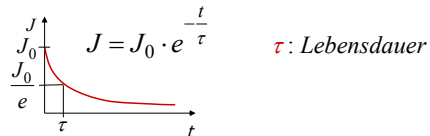
Stokes-Verschiebung: $\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}$

Strahlungsloser Übergang
Übergang mit Strahlung

26

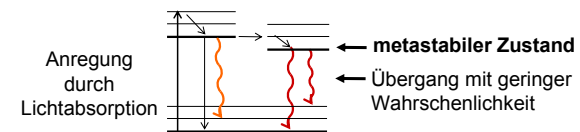
Eigenschaften des Lumineszenzlichtes

- Wellenlänge und Intensität der Linien in dem Spektrum
- Stokes-Verschiebung $[\bar{\epsilon}_{lumin} \leq \bar{\epsilon}_{abs}]$
- Quantenausbeute: $Q = \text{emittierte Photonen} / \text{absorbierte Photonen} (< 1)$
- Lebensdauer:



27

Fluoreszenz und Phosphoreszenz



Fluoreszenz **Phosphoreszenz**

$$\bar{\epsilon}_{phos} \leq \bar{\epsilon}_{fluo} \leq \bar{\epsilon}_{abs}$$

$$\bar{\lambda}_{abs} \leq \bar{\lambda}_{fluo} \leq \bar{\lambda}_{phos}$$

$$\bar{\tau}_{fluo} \ll \bar{\tau}_{phos}$$

z. B. Tryptophan:

$$\bar{\lambda}_{fluo} = 340 \text{ nm}$$

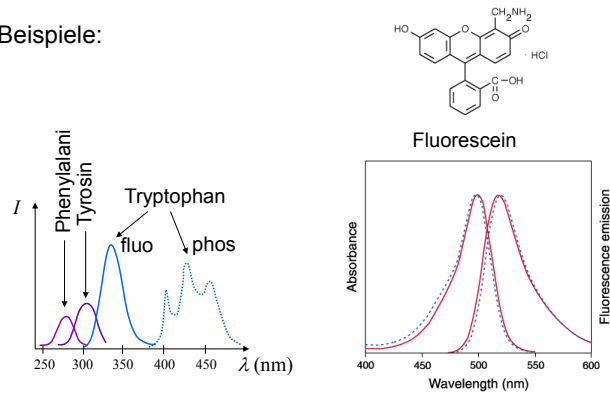
$$\bar{\lambda}_{phos} = 440 \text{ nm}$$

$$\tau_{fluo} = 0,1 - 5 \text{ ns}$$

$$\tau_{phos} = 0,001 - 5 \text{ s}$$

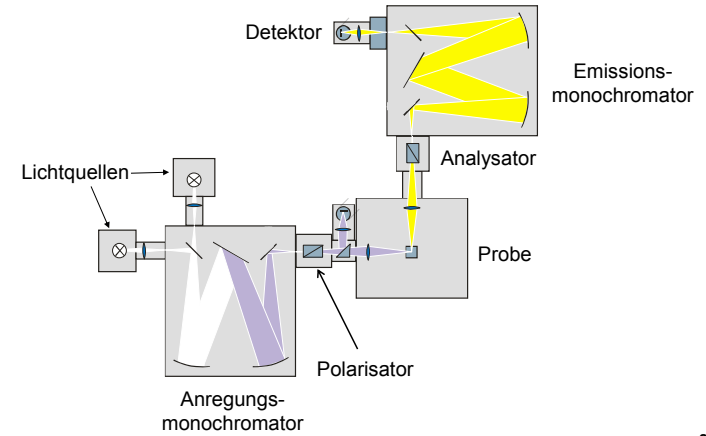
28

Beispiele:



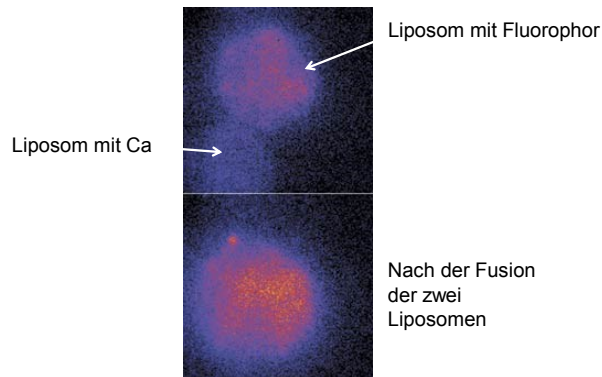
29

Messung – Aufbau eines Luminometers



30

Beispiele:



31

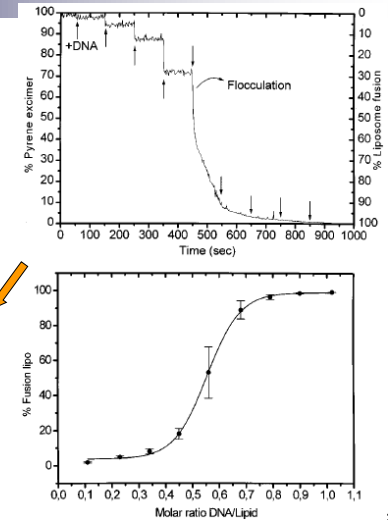
Wechselwirkung zwischen DNA und Liposomen (*Fortsetzung*):

Fluorophor:
Pyren

Pyren Excimer (~ Konzentration)



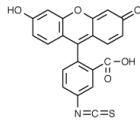
Die Fluoreszenz von Pyren nimmt ab
⇒ Fusion



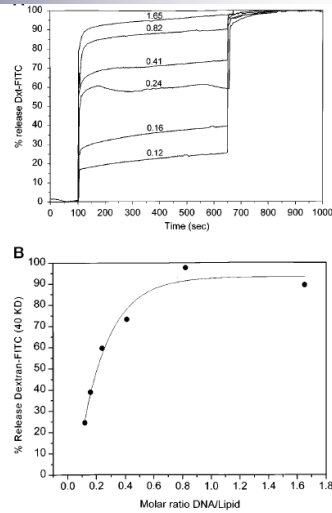
32

Fluorophor:
Dextran mit FITC

(FITC: Fluorescein-isothiocyanat)

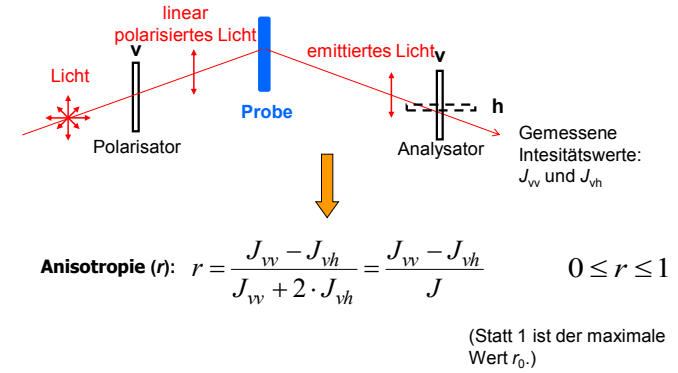


DNA destabilisiert die
Liposomen \Rightarrow Fusion und
Ausströmung von
Dextran



33

Messung der Anisotropie



34

Perrin-Gleichung: $r = \frac{r_0}{1 + \tau / \phi}$

ϕ : Korrelationszeit der Rotationsdiffusion

$$\phi = \frac{\eta \cdot V}{kT}$$

η : Viskosität

V : Volumen d. Molekül(teils)

k : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

η : Mikroviskosität
($1/\eta$: Mikrofluidität)

Die Anisotropiewerte können auf Mikroviskosität umgerechnet werden. Größere Anisotropie bedeutet größere Viskosität.

35

Beispiele:

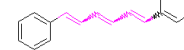
Mikroskosität von Liposomen bei verschiedenen Temperaturen

Liposom: DPPC

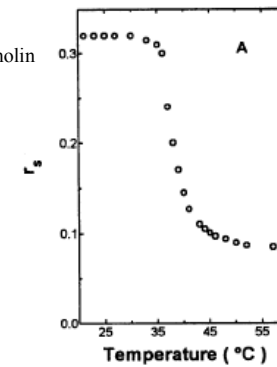
DPPC: Dipalmitoilphosphatidylcholin

Fluorophor: DPH

DPH: Diphenylhexatrien



Überhalb der Phasenumwandlungstemperatur nimmt die Mikroviskosität der Lipidschicht wesentlich ab.



36

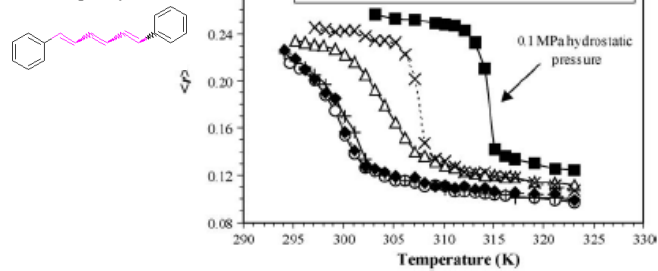
Einfluss von Alkanen und von Druck auf die Mikroviskosität von Liposomen

Liposom: DPPC

DPPC: Dipalmitoilphosphatidylcholin

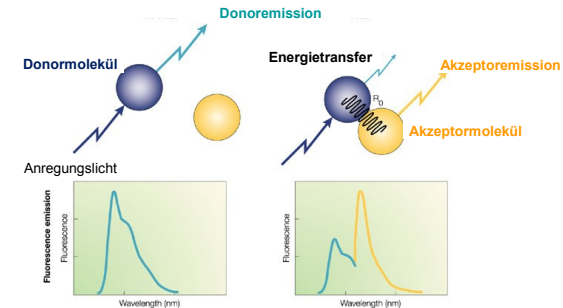
Fluorophor: DPH

DPH: Diphenylhexatrien



37

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)



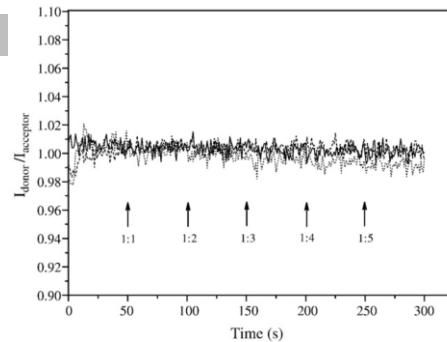
Gemessene Größe: Intensitätsverhältnis von Donor- und Akzeptoremissionen

Starke Abhängigkeit vom Abstand!
„molekularer Maßband“

38

Beispiel: Wirkung von nicht-steroidalen Antiphlogistika auf die Zellmembran (Fortsetzung)

FRET



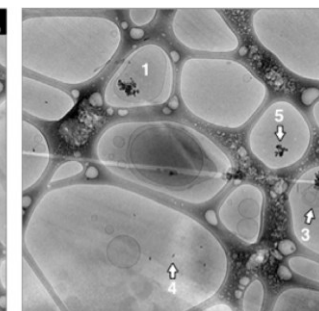
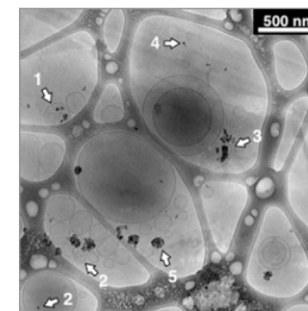
Keine Änderung

Die untersuchten Antiphlogistika dringen zwischen die Lipidmoleküle nicht ein.

39

Magnetoliposomen

Liposom: DPPC+Cholesterin
Magnet: Fe_3O_4 Nanopartikel



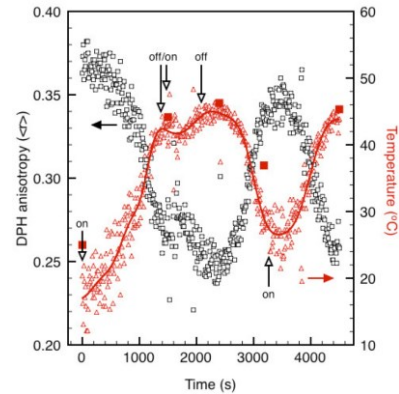
(TEM-Aufnahmen)

40

Erwärmung mit Hilfe von Radiowellen

$f = 281 \text{ kHz}$

Fluorophor: DPH



41

Beispiel: Planung von Liposomen mit Temperaturaktivierung



BASIC SCIENCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
10 (2014) 1243–1252



nanomedjournal.com

Original Article

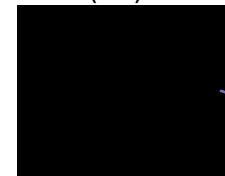
Principles of rational design of thermally targeted liposomes for local drug delivery

Roberto Tejera-Garcia, PhD¹, Petteri Parkkila, BSc¹,
Vladimir Zamotin, PhD, Paavo K.J. Kinnunen, PhD*

¹Helsinki Biophysics and Biomembrane Group, Department of Biomedical Engineering and Computational Science, School of Sciences,
Aalto University, Espoo, Finland

Received 7 January 2014; accepted 20 March 2014

**Doxorubicin
(Dox)**



Zytostatikum
mit vielen
Nebenwirkungen

Zielssetzung:
hohe Wirkstoffkonzentration in
dem Tumorgewebe, niedrige
Konzentration in dem gesunden
Gewebe

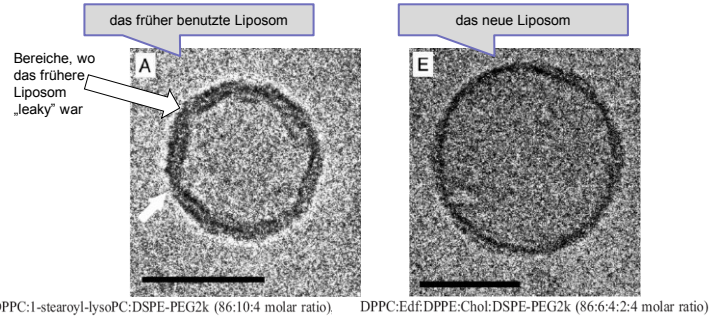
ein fluoreszierendes Molekül

42

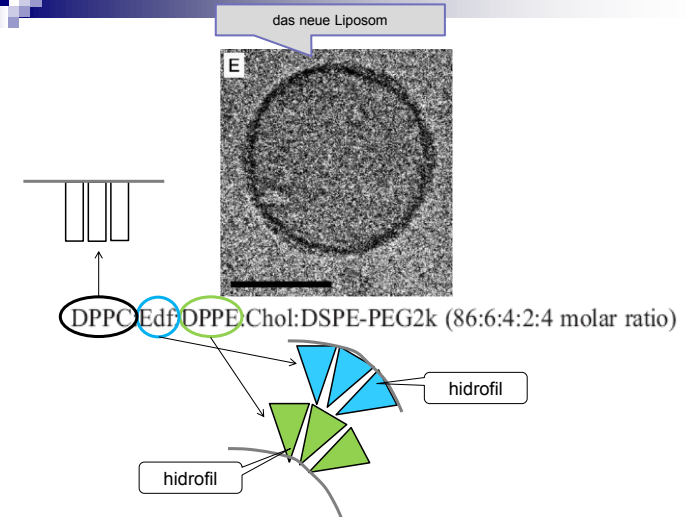
Prinzip:

1. Lokale Erwärmung des Tumors auf $39\text{--}41^{\circ}\text{C}$ (T_R), z. B. mit Hilfe von MRlgHIFU
2. Wirkstoff in solchen Liposomen deren
 - a) Umwandlungstemperatur der Gel→Fluid Umwandlung nah zu T_R liegt,
 - b) Wirkstoffemission unterhalb T_R gering, nah zu T_R stark ist.

Planung des Liposoms:



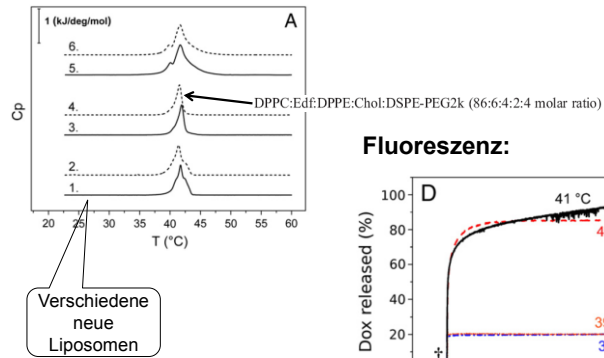
43



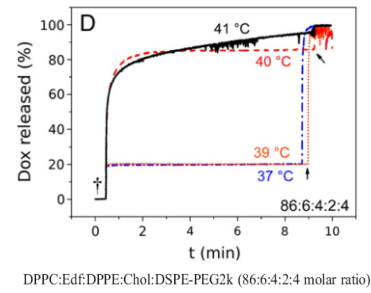
44



DSC:



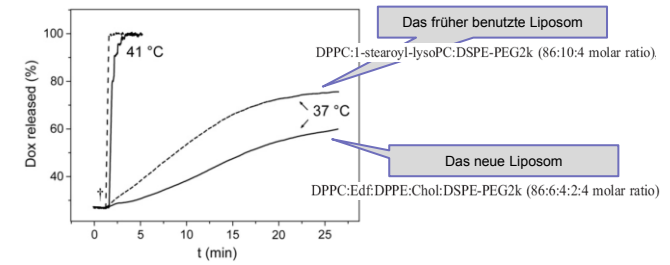
Fluoreszenz:



45



Fluoreszenz:



46