



Doctoral Thesis

Preparation and properties of DNA containing liposomes

Author(s):

Monnard, Pierre-Alain Michel

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001889757> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 12500

Preparation and Properties of DNA Containing Liposomes

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

PIERRE-ALAIN MICHEL MONNARD

Dipl. Chem. ETH

born May 23, 1969

Citizen of Daillens, Vaud

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P.L. Luisi, examiner

Prof. Dr. H. Grützmacher, co-examiner

Zürich 1997

II. Abstract

In this work, the entrapment efficiencies of three main methods used in the literature for the encapsulation of nucleic acids in liposomes were studied using 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) liposomes. In particular the reverse-phase evaporation method, the dehydration/rehydration method, and the freeze/thawing method were compared to each other under standardized conditions, i.e. using the same concentration of guest molecules (DNA, tRNA and ATP as a low molecular weight analogue) in every case and equally extruded liposomes. Since the percentage of entrapment should strictly refer to the material localized inside the liposomes, particular care was devoted to eliminating the substance bound to the outer surface of the liposomes by extensive enzymatic digestion prior to column chromatography. Depending on the conditions used, the percentage of the entrapped material varied between 10 and 30% of the initial amount. Furthermore, the encapsulation efficiency was affected by the size of liposomes, but to a lower degree by the molecular weight of the guest molecules.

The freeze/thawing encapsulation procedure, which was clearly the most efficient one, was then applied to encapsulate DNA (369 bp and 3368 bp, respectively) with liposomes obtained from POPC mixed with 1 to 10% charged cosurfactant, i.e. phosphatidylserine (PS) or didodecyldimethylammonium bromide (DDAB), respectively. Whereas PS had no significant effect, the entrapment efficiency went up to 60% in POPC/DDAB (97.5:2.5) liposomes. The large entrapment efficiency of DNA permitted spectroscopic investigations of the DNA encapsulated in the water pool of the liposomes. UV absorption and circular dichroism spectra were practically the same as in water, indicating no appreciable perturbation of the electronic transitions of the entrapped biopolymers. This was in contrast to the DNA bound externally to the POPC/DDAB liposomes, which showed significant spectral changes with respect to DNA dissolved in water.

In the second part, it was established that the trapping efficiency was also affected by an external parameter, the ionic strength of the medium. With all the salts studied (NaCl, NaI, NaOAc, LiCl and KCl at 50, 100, 150, and 200 mM concentrations), the trapping yields of frozen/thawed POPC liposomes dropped significantly (around 40-60% of those obtained in the absence of salt) apparently at a threshold salt concentration (at around 50 mM) for all the solutes tested (lysine, glucose and polynucleotides). Simi-

lar experiments with glucose were also realized to determine whether the decrease of trapping efficiency was a peculiar property of salt. They gave similar results. However, the extent of their decline was slightly larger than with salt.

The reasons for this decline were investigated by freeze/fracture and cryotransmission electron microscopy: it was established that in the presence of salt, the mean size of the aggregates did not vary enough to account for the loss of entrapment. Moreover, salts induced the formation of large lipidic structures (denoted here “black bodies” due to the dark shadowing they displayed on cryo-TEM micrographs) which were thought to be filled up with concentric bilayers. Their number augmented as the salt concentration increased, and, according to theoretical calculations, up to 37% of the total amount of lipids could participate in the formation of these aggregates at 200 mM NaCl. Simultaneously, the overall average lamellarity slightly declined from 1.36 to 1.22 lamella per liposome without salt and with 200 mM NaCl, respectively. On the other hand, glucose seemed to induce an elevation of the mean lamellarity from 1.36 to 1.74 lamella per liposome at a concentration of 353 mM.

The conclusion of this study was that the observed declines of entrapment yields should be ascribed to two distinct morphological alterations of the liposomes: to the emergence of these black bodies in the presence of salt and to the increase of their overall lamellarity with glucose.

In the last part of this work, the encapsulation of hydrophilic solutes (glucose-1-phosphate, dNTPs, tRNA, myoglobin and cytochrome c) induced by cholate incorporated in the POPC bilayers was investigated. It was found that the presence of bile salt (BS) in POPC liposomes could yield the capture of hydrophilic solutes externally added to the vesicles (up to 10% of the initial amount of substance to be entrapped), which were otherwise totally impermeable to them. This should be related to perturbations in the packing order of the POPC bilayers upon the incorporation of BS into them. In addition, the measured entrapment kinetic seemed to demonstrate that the influx rate could be correlated to the solute concentration gradient across the membrane. Furthermore, the onset of the entrapment was dependent on a well-defined molar ratio of added cholate to POPC, which varied with the molecular weight of the solute, rather than with its concentration. The decrease of trapping efficiency observed at high BS concentrations was

ascribed to a partial solubilization of the liposomes.

Finally, the detergent-induced liposome loading (DILL) was shown to be long-lasting, and not restricted to the period of cholate incorporation within the POPC bilayers. Indeed, after the incubation of mixed liposomes for up to 72 h before the solute addition, the entrapment yields were similar to those found when the substance to be encapsulated and the BS were added simultaneously to POPC liposomes.

III. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Einschluss von hydrophilen Substanzen in Liposomen untersucht.

Zuerst wurden drei für das Einschliessen von hydrophoben Substanzen in Liposomen oft benutzte Methoden ("freeze/thaw", "dehydration/rehydration" und "reverse-phase evaporation") unter standardisierten Bedingungen verglichen: Die Konzentration der einzuschließenden Stoffe (DNA, tRNA und ATP) wurde immer gleich gehalten und die aus POPC bestehenden Liposomen gleich extrudiert. Wichtig war dabei, dass kein Material an der Oberfläche der Membranen gebunden blieb. Deshalb wurden nicht eingeschlossene Moleküle sorgfältig enzymatisch verdaut und anschließend von den Liposomen mittels Gel Filtration-Chromatographie getrennt. Je nach Methode und Liposomengröße wurden zwischen 10% und 30% der eingesetzten Substanzen eingeschlossen. Hingegen beeinflusste die Größe der einzuschließenden Moleküle den Einschluss nur geringfügig.

Da die "freeze/thaw" Methode unter den gewählten Bedingungen am effizientesten war, wurde sie angewandt, um den Einfluß der Liposomenzusammensetzung auf den Einschluss von DNA (368 bp- und 3368 bp-Fragmente) zu erforschen. Gemischte Liposomen mit 1-10 mol% geladenen Tensiden, entweder Phosphatidylserine oder Didodecylammonium, wurden hergestellt. Während der Einschluss in Anwesenheit von PS unverändert blieb, stieg er bis zu 61% im Fall von positiv geladenen Aggregaten (POPC/DDAB, 97.5:2.5). Die Konformation der eingeschlossenen Makromoleküle wurde dann mittels CD- und UV/vis-Spektroskopie untersucht. Die Spektren unterscheideten sich kaum von denjenigen der im Wasser gelösten Stoffe, was eine Aenderung des elektronischen Zustandes der Moleküle ausschloss. Im Gegensatz dazu zeigten DNA-Fragmente, die an der Oberfläche von positiv geladenen Liposomen gebunden waren, signifikante Aenderungen in ihren Spektren auf.

Die Erhöhung der Ionenstärke oder des Glucose-Gehaltes im Puffer beeinflusste die Einschlussergebnisse beträchtlich: Mit allen untersuchten Salzen (NaCl, NaI, NaOAc, LiCl, KCl) sank der Einschluss auf 40-60% des ohne Salz gemessenen Wertes. Diese Abnahme war aber nicht proportional zu der eingesetzten Salzmenge, sondern sie

tritt anscheinend ab einer Konzentrationsschwelle von ungefähr 50 mM Salz auf. Mit Glucose, bei osmolalen Konzentrationen zu NaCl (88, 353 mM Glucose), wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet, was einen salzspezifischen Effekt ausschloss.

Wie die Cryo-TEM Aufnahmen es bewiesen, war dieser Einfluß von Salzen und Glucose (die Abnahme des Einschlusses) hauptsächlich auf Änderungen der Lamellarität der Liposomen zurückzuführen. In der Tat wurde die Erscheinung eines neuen mit unzähligen Doppelschichtmembranen gefüllten Aggregates, benannt hier "black body" (Schwarzer Körper), in Anwesenheit von Salz festgestellt, dessen Anzahl mit zunehmender Salzkonzentration stieg. In Suspensionen mit 200 mM NaCl wurde gerechnet, dass diese Strukturen bis zu 37% von der gesamten Lipidmenge beanspruchten. Gleichzeitig ging die gesamte Lamellarität der übrigbleibenden Liposomen von 1.36 (ohne Salz) auf 1.22 lamella pro Liposome (200 mM NaCl) zurück. Im Gegensatz dazu in Suspensionen mit Glucose, bei osmolalen Konzentrationen, zeichnete sich eine Steigerung der gesamten Lamellarität von 1.36 auf 1.74 lamella pro Liposome (353 mM Glucose) ab.

Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass das ähnliche Einschlussverhalten in Anwesenheit von Salzen und Glucose sehr wahrscheinlich auf zwei unterschiedlichen morphologischen Änderungen der Liposomen beruhte.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit eines Einschlusses hydrophiler Substanzen (Glucose-1-phosphate, dNTPs, tRNA, Myoglobine, Cytochrom c) mittels Diffusion durch die mit Detergens behandelten POPC Membranen untersucht. Die Permeabilität der Doppelschichtmembrane wurde zuerst mit Cholat erhöht, was den Einschluss von bis zu 10% des anschließend eingesetzten Materials ermöglichte. Ohne Detergens blieben POPC-Membranen praktisch impermeabel. Diese erhöhte Diffusion schien darauf zu beruhen, dass die Aufnahme von Cholat-Molekülen in die Doppelschichtmembranen eine Störung der Packungseigenschaften der POPC verursachte. Dazu zeigten kinetische Messungen des Einschlusses, dass die Permeationsgeschwindigkeit der hydrophilen Stoffe von ihrem Konzentrationsgradient abhängen sollte. Zusätzliche Untersuchungen bewiesen, dass das Verhältnis zwischen zugegebener Cholatmenge und derjenigen von POPC der entscheidende Parameter war, um die Diffusion beobachten zu können. Dieses Verhältnis war abhängig von dem molekularen Gewicht des einzuschliessenden Stoffes und nicht von dessen Konzentration. Bei hohen Cholat-

konzentrationen war die Abnahme des Einschlusses mit einer partiellen oder vollständigen Solubilisation der Liposomen verbunden.

Schließlich wurde gezeigt, dass sich der Effekt der Cholatinkorporierung auf dessen Zugabe nicht beschränkte. Der einzuschliessende Stoff konnte bis auf 72 Stunden nach dem Cholat addiert werden, ohne Verringerung der Ausbeute.
