



Doctoral Thesis

Liposomen als Enzym-enthaltende Nanoreaktoren Untersuchungen zur Erhöhung der Mononukleotid-Permeabilität

Author(s):

Treyer, Mike

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004227818> →

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 Nr. 14347

**Liposomen als Enzym-enthaltende Nanoreaktoren:
Untersuchungen zur Erhöhung der Mononukleotid-Permeabilität**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

vorgelegt von
MIKE TREYER
Dipl. Chem. ETH
geboren am 22. Oktober 1972
von Herznach AG

Angenommen auf Antrag von:
Prof. Dr. Pier Luigi Luisi, Referent
Prof. Dr. Donald Hilvert, Korreferent
Prof. Dr. Peter Walde, Korreferent

Zürich 2001

Zusammenfassung

Die von Rolf Schubert anfangs der 90iger Jahre begründete "DILL"-Methode (Detergent-Induced Loading of Liposomes; Schubert, R., *Proc. MoBBEL*, **5**, 73-82, 1990; Schubert, R., Wolburg, H., Schmidt, K. H., Roth, H. J., *Chem. Phys. Lip.*, **58**, 121-129, 1991), welche es ihm ermöglichte, grosse hydrophile Moleküle (z.B. Dextrane mit Molekulargewichten bis zu 70'000 g \cdot mol $^{-1}$) ins Innere von vorgeformten Phosphatidylcholin (PC) Liposomen zu bringen, ohne diese dabei zu zerstören, wurde in der vorliegenden Arbeit auf ihre Anwendbarkeit für den Einschluss von Proteinen in PC-Liposomen geprüft. Dabei wurde POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) als liposomenbildendes Lipid und Natriumcholat als Tensid verwendet. Die hauptsächlich verwendeten Liposomen waren unilamellar mit Durchmessern von ca. 100 nm.

Für die Anwendung der DILL-Methode war es notwendig, diejenigen Bedingungen herauszufinden, unter welchen die Interaktionen von Cholat mit POPC-Vesikel in equilibrierten Systemen zur Bildung von gemischten Vesikel führten, nicht aber zur Bildung von gemischten Mizellen. Dem theoretischen 3-Stufen-Modell der Solubilisation von PC-Liposomen durch Tenside folgend konnte mit Trübungs- und Lichtstremessungen die totale Cholatkonzentration bei Membransättigung (D_t^{sat}) und bei kompletter Membransolubilisation (D_t^{sol}) für die drei untersuchten Systeme (30 mM POPC in 50 mM Tris, pH 8; 30 mM POPC in 100 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, pH 8; 5 mM POPC in 100 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, pH 8) bestimmt werden. Auf dieselbe Weise war es möglich, die Zusammensetzung der gemischten Vesikel bei Membransättigung (R_e^{sat}) und die Zusammensetzung der gemischten Mizellen bei kompletter Membransolubilisation (R_e^{sol}) zu bestimmen, wobei R_e das molare Verhältnis von Cholat in den Aggregaten zu POPC ausdrückt. Unter Verwendung eines Gleichgewichtsverteilungsmodells von Tensiden zwischen Lipid- und wässriger Phase konnten die Gleichgewichtskonstanten (K) für die Verteilung von Cholat in den untersuchten (und equilibrierten) Systemen bestimmt werden. Die erhaltenen K -Werte gestatteten es, die Zusammensetzung (R_e) der gemischten POPC/Cholat-Aggregate (Liposomen und Mizellen) für jede beliebige POPC/Cholat-Mischung zu berechnen.

Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie-Bilder zeigten jedoch, dass die Membransolubilisation bereits bei kleineren R_e -Werten als bei dem durch Trübungsmessungen erhaltenen R_e^{sat} auftrat. Daraus konnte einerseits geschlossen werden, dass die häufig

verwendeten, einfachen Modelle zur Beschreibung der PC-Liposomen/Tensid-Interaktionen (3-Stufen-Modell; Gleichgewichtsverteilungsmodell) nur grobe Näherungen sind. Andererseits wurde nahe gelegt, dass man vorsichtig sein muss mit Vesikelsolubilisations-Untersuchungen, welche nur auf Streumethoden beruhen.

Durch die Kombination von Trübungsmessungen, Lichtstreu-Untersuchungen und Analyse von EM-Bildern gelang es, die gesuchten Bedingungen, unter welchen gerade noch keine POPC-Vesikel durch Cholat mizellisiert wurden, für die untersuchten Systeme herauszufinden.

Die DILL-Methode wurde für ein kleines, monomeres Protein (Proteinase K mit einem Molekulargewicht von $28'500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und für ein grosses Protein (Ferritin mit einem Molekulargewicht von $900'000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) unter Verwendung von POPC und Cholat geprüft. Beide Proteine konnten erfolgreich mit Hilfe von Schuberts Methode in die Liposomen eingeschlossen werden. Es wurde gefunden, dass die Einschlusseffizienz, neben ihrer Abhängigkeit von der Cholatkonzentration, auch abhängig von der Grösse der einzuschliessenden Proteine war. Unter maximalen "uptake"-Bedingungen betrug die Einschlusseffizienz im Falle von Proteinase K beinahe 100 %, im Falle von Ferritin nur gerade ca. 2 - 8 %.

Durch Vergleich der totalen POPC- und Cholat-Konzentrationen bei Membransättigung mit den Bedingungen, unter welchen die gemischten Liposomen mit Proteinen beladen werden konnten, wurde festgestellt, dass es nur möglich war, die Liposomen mit Makromolekülen zu beladen, wenn die POPC-Vesikel in den equilibrierten Systemen bereits (wenigstens teilweise) durch Cholat mizellisiert vorlagen. Erst durch die Verdünnung des Systems, hervorgerufen durch die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) -Abtrennung der nicht eingeschlossenen Proteine von den Liposomen, konnten sich die Vesikel komplett wiederbilden. Die Resultate deuten darauf hin, dass die Vesikel in früheren DILL-Experimenten, bei welchen kinetische Effekte unmittelbar nach der Cholatzugabe zu den Liposomen ausgenutzt wurden, entweder kurzzeitig zerstört wurden und sich nach der Equilibration des Systems wieder bildeten ($R_e < R_e^{\text{sat}}$) oder sogar nach der Equilibration des Systems noch teilweise zerstört vorlagen und sich erst nach der anschliessenden Verdünnung des Systems durch die GPC-Analyse wiederbildeten ($R_e > R_e^{\text{sat}}$).

Unter Bedingungen, unter welchen noch keine Membransolubilisierung auftrat, wurde der Effekt des Einbaus von Cholat in POPC-Liposomen auf die Permeabilitätseigenschaften der gemischten Vesikel gegenüber Mononukleotiden (ADP, UMP, UDP oder UTP) untersucht. Dabei wurde der kaum bekannte Prozess der Permeation von wasserlöslichen Substanzen vom

äusseren Medium ins Liposomeninnere betrachtet. Es konnte anhand sogenannter "Beladungs-experimente" nachgewiesen werden, dass die sehr geringe Permeabilität von POPC-Liposomen gegenüber Mononukleotiden durch den Cholateinbau ca. 10 mal erhöht wurde. Es wurde gefunden, dass sich diese Mononukleotide tatsächlich innerhalb der Liposomen befanden.

Auch der Einbau von 1-Oktanol und 1-Dodekanol, nicht aber der Einbau von Ethanol in POPC-Liposomen führte unter den experimentellen Bedingungen zu einer Erhöhung der Permeabilität der gemischten, intakten Vesikel gegenüber Mononukleotiden (ADP). Das Ausmass dieser Erhöhung konnte nicht quantitativ bestimmt werden, dazu bedürfte es anderer Analysemethoden.

Anhand der erzielten Resultate konnte das eigentliche Ziel der Arbeit - die Herstellung von Polynukleotid-produzierenden Nanoreaktoren, welche sich auch für die Anwendung als Protozellen-Modelle eignen - realisiert werden. Dazu wurde ein Katalysator - Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) - in POPC-Liposomen eingeschlossen. Der Einbau von Cholat (unter Bedingungen, unter welchen die Vesikel noch intakt waren) änderte die Permeabilität der Doppelschichten selektiv. Substratmoleküle (ADP) konnten vom äusseren Medium ins Liposomeninnere gelangen, der eingeschlossene Katalysator, sowie das endovesikulär gebildete Polymer - Poly (A) - jedoch nicht vom Liposomeninneren ins äussere Medium.

Die Realisierung der Nanoreaktoren stellte sich allerdings als sehr schwierig heraus, v.a. wegen der geringen Stabilität der verwendeten PNPase-Präparationen und der vermuteten RNAase E-Verunreinigungen, durch welche die gebildeten Polymere nach relativ kurzer Zeit wieder abgebaut wurden. Die geringe Stabilität der PNPase-Präparationen war auch dafür verantwortlich, dass dieses Enzym nicht, wie ursprünglich geplant, anhand der DILL-Methode in die POPC-Liposomen eingeschlossen werden konnte.

Am Schluss wurden einige Experimente zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Liposomen (reine POPC- oder gemischte POPC/Didodecyldimethylammoniumbromid (DDAB) -Liposomen) und RNS - durch PNPase hergestelltes Poly (A) - durchgeführt. Es konnte mit Lichtstreu- und CD-Messungen nachgewiesen werden, dass die Interaktionen von anionischem Poly (A) mit kationischen POPC/DDAB-Liposomen, nicht aber mit zwitterionischen POPC-Liposomen, zu grösseren Gebilden oder Aggregaten führten. Es wurde weiter festgestellt, dass POPC, welches sich in diesen Aggregaten aus POPC/DDAB-Liposomen und Poly (A) befand, unter den experimentellen Bedingungen schneller - katalysiert durch die Phospholipase A₂ - abgebaut wurde als POPC, welches sich in gemischten POPC/DDAB-Liposomen in Abwesenheit von Poly (A) befand.

Abstract

The so called "DILL" method (Detergent-Induced Loading of Liposomes) which was developed by Rolf Schubert in the early 90s (Schubert, R., *Proc. MoBBEL*, **5**, 73-82, 1990; Schubert, R., Wolburg, H., Schmidt, K. H., Roth, H. J., *Chem. Phys. Lip.*, **58**, 121-129, 1991) was tested for its applicability in the encapsulation of proteins in phosphatidylcholine (PC) vesicles. This method allowed Schubert to include large hydrophilic molecules (such as dextrans with molecular weights up to 70'000 g \cdot mol $^{-1}$) into PC-liposomes without destroying them in the process. For this reason, POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) was chosen as the liposome-forming lipid and sodium cholate as the detergent in the present work. The liposomes used were mainly unilamellar with diameters of about 100 nm.

For the implementation of the DILL method it was necessary to find conditions where the interaction of cholate with POPC-vesicles in equilibrated systems leads to the formation of mixed vesicles but not to the formation of mixed micelles. In accordance with the theoretical 3-stage-model of solubilization of PC liposomes by detergents, the total cholate concentration at saturation (D_t^{sat}) and at complete solubilization (D_t^{sol}) of the POPC bilayers was determined via turbidity- and dynamic light scattering measurements for three separate systems (30 mM POPC in 50 mM Tris, pH 8; 30 mM POPC in 100 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, pH 8 and 5 mM POPC in 100 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, pH 8). In the same way, the composition of the mixed vesicles at membrane-saturation (R_e^{sat}) and the composition of the mixed micelles at complete solubilization (R_e^{sol}) of the bilayers was determined, with R_e being the molar ratio of cholate in the mixed aggregates to POPC. Using an equilibrium partitioning model of detergents between lipid and water phase, the partition coefficients (K) of cholate in the investigated (and equilibrated) systems could be determined. These K -values allowed the calculation of the composition (R_e) of the POPC/cholate mixed aggregates (liposomes and micelles) for any POPC/cholate mixture.

Freeze-fracture electron micrographs, however, showed that solubilization of the mixed bilayers began at R_e -values lower than the R_e^{sat} -value determined turbidimetrically. This finding indicates that the simple models that are often used to describe PC liposome/detergent interactions (3-stage-model; equilibrium partitioning model) are only rough approximations. It

also shows that care has to be taken if vesicle solubilization studies are based only on measurements of turbidity changes.

By combining turbidity studies, dynamic light scattering measurements and analysis of electron micrographs, suitable conditions could be established under which the POPC vesicles remain intact and bilayer solubilization does not occur in the presence of cholate.

The DILL method was applied to a small, monomeric protein (proteinase K with a molecular weight of 28'500 g* mol^{-1}) and for a large protein (ferritin with a molecular weight of 900'000 g* mol^{-1}), using POPC and cholate. Liposomes could be loaded successfully with both proteins with the help of Schubert's method. It was found that encapsulation efficiency, apart from its dependence on cholate concentration, also depended on the size of the protein to be included. At conditions of maximal uptake, encapsulation efficiency in the case of proteinase K was almost 100 %. In the case of ferritin, it was only about 2 - 8 %.

By comparing the total POPC- and cholate-concentrations at membrane saturation with the conditions where protein uptake took place, it was found that POPC vesicles could be loaded with macromolecules in equilibrated systems only when the vesicles were already (at least partly) micellized by cholate. Only upon dilution of the system during separations of non-entapped proteins from the liposomes by gel permeation chromatography (GPC) the vesicles did reform completely. These results indicate that the vesicles in earlier DILL experiments (where advantage was taken of kinetic effects immediately after the addition of cholate to the liposomes) were either transiently destroyed and reformed after equilibration of the system ($R_e < R_e^{\text{sat}}$) or were even permanently (at least partly) destroyed and reformed only as a consequence of the dilution of the system during GPC analysis ($R_e > R_e^{\text{sat}}$).

The effect of integrating cholate into POPC liposomes on the permeability properties of mixed vesicles towards mononucleotides (ADP, UMP, UDP or UTP) was investigated under conditions where bilayer solubilization did not occur. The process by which water soluble molecules permeate from the outer medium into the liposome's interior is poorly understood, and "loading" experiments showed that the low permeability of POPC vesicles towards mononucleotides could be increased approximately 10-fold by incorporation of cholate. The mononucleotides were shown to accumulate within the interior cavity of the liposomes.

Incorporation of 1-octanol and 1-dodecanol but not ethanol into POPC liposomes leads, under the experimental conditions used, to an increase of the permeability of mixed, intact vesicles towards mononucleotides (ADP) as well. The magnitude of this increase could not be

determined quantitatively, and other methods of analysis will be required to understand this effect in detail.

Using the foregoing results, the main goal of this work - fabrication of polynucleotide-producing nanoreactors as models of protocells - could be realized. To do so, a catalyst - polynucleotide phosphorylase (PNPase) - was entrapped in POPC liposomes. The incorporation of cholate (at concentrations that do not disrupt the vesicles) selectively altered the permeability of the bilayers, allowing the uptake of substrate molecules (ADP) from the bulk medium but not the release of either the encapsulated catalyst or the endovesicularly formed polynucleotide poly (A).

The construction of these nanoreactors turned out to be very difficult, mostly because of the low stability of the PNPase preparations used and the contaminating RNAase E impurities that degraded the produced polymers after a short time. The low stability of the PNPase preparations also precluded entrapping the enzyme in POPC vesicles via the DILL method as originally planned.

Finally, several experiments were performed to investigate the interactions between liposomes (pure POPC or mixed POPC/Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) vesicles) and RNA (poly (A) prepared by PNPase). Using dynamic light scattering and CD measurements, it could be shown that interactions of the anionic poly (A) with the cationic POPC/DDAB vesicles, but not with the zwitterionic POPC vesicles, lead to the formation of larger entities or aggregates. It was further found that POPC in the aggregates formed between mixed POPC/DDAB vesicles and poly (A) was degraded more rapidly by the catalyst phospholipase A₂ than POPC in mixed POPC/DDAB vesicles in the absence of poly (A).