

Diss. ETH No. 14678

Phagocytosis and intracellular fate of synthetic particles in dendritic cells and macrophages

A dissertation submitted to the
**Swiss Federal Institute of Technology
Zurich (ETH)**

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Lars Erik Thiele
Pharmacist
born July 30st, 1969
Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner
Dr. E. Walter, co-examiner
Prof. Dr. C.-M. Lehr, co-examiner

Zurich 2002

Summary

Phagocytosis of particulate material offers an elegant route for the delivery of antigens by particulate carriers to important APC such as DC. However, particulates need to be optimized in order to be efficiently phagocytosed by DC which are significantly more selective in phagocytosis compared to M Φ . Therefore, this thesis is focussed on methods to evaluate phagocytosis of particulates by APC, on influences concerning size and surface properties of particles as well as effects of adsorbed serum proteins on the phagocytosis capacity of DC and on the intracellular fate of particulates after phagocytosis by DC.

In the first chapter, the progress in the field of phagocytosis of biological and synthetic particulates by DC was reviewed including its implications on immunomodulation. The review will introduce the reader into the complex life cycle and various functions of DC which are closely related to their differentiation stages. Moreover, methods for the in vitro differentiation of DC are presented and the phagocytosis capacity of DC is compared with based on various techniques to assess phagocytosis. With respect to phagocytosis, efficiency and intracellular trafficking, physico-chemical properties of MP concerning size and surface properties are discussed based on the mechanism of phagocytosis and phagosomal maturation. As a prerequisite of antigen-(cross-) presentation from various phagocytosed materials to T cells, DC undergo maturation after the phagocytosis of antigens which is discussed with respect to physico-chemical particle properties. Finally, implications for the development of vaccine carriers are summarized and an outlook for a DC-based immunotherapy in humans is given.

Chapter II deals with MP as potential antigen delivery systems to target professional APC. Surface modified polystyrene MP were administered to human-derived M Φ and DC in vitro in order to evaluate the phagocytosis

activity of each cell type. To discriminate between internalised particles and those closely attached to the outside of the cells, particle internalisation was verified by confocal laser scanning microscopy. Especially positively charged MP tend to stick to the outer cell membrane and may lead to false positive results when measured by conventional microscopy. In contrast, fluorescence microscopy in combination with an extracellular fluorescence quenching agent (trypan blue) allows the unequivocal assessment of particle uptake for screening purposes. Based on these methods, different types of MP varying in size, surface-material and ζ -potential resulted in vast differences regarding their uptake by M Φ and DC. Negatively-charged carboxylated and BSA-coated particles were phagocytosed by M Φ to a relatively small extent. Interestingly, phagocytosis of these particles was still significantly lower in DC while positively charged poly-L-lysine-coated (PLL) MP induced high phagocytosis activity in both cell types. By comparing our results with literature data, we conclude that phagocytosis activity of DC and M Φ largely depends on particle size and surface charge and is also influenced by the character of bulk and coating material. PLL MP can be targeted to DC and M Φ with comparable efficiency and may be used as a potential carrier for antigen delivery.

Cationic MP have been demonstrated to enhance phagocytosis by APC and were efficiently internalized by phagocytic cells which display a generally lower phagocytic capacity, such as DC. In chapter III, MP were surface-modified by covalent coating with proteins and polyamines resulting in negatively and positively charged hydrophilic surfaces and phagocytosis was assessed in human-derived DC and M Φ by using fluorescence-labeled MP and quenching of extracellular fluorescence with trypan blue. Due to the pH-sensitivity of the fluorescence label, this method allowed to determine the pH of the microenvironment of the phagocytosed MP. Cationic MP were most efficiently phagocytosed by both, M Φ and DC, resulting in an elevated pH of 6.0 to 6.8 in

the immediate vicinity of the phagocytosed MP. In contrast, protein-coated MP were phagocytosed to a considerably lower extent with significant differences in M Φ and DC, and were found in an acidified intracellular milieu. Electron microscopy studies revealed phagocytosis of cationic MP by formation of active protrusions resulting in phagosomes with tightly fitting phagosomal membranes. Phagocytosis in a zipper-like manner in combination with intraphagosomal buffering is suggested to lead to delayed phagosomal acidification. In conclusion, cationic MP are likely to be promising carriers for the intracellular delivery of immunomodulating therapeutics which must be protected against lysosomal degradation to display their full activity.

Serum protein adsorption to the surface of particulate synthetic drug carrier systems has a major influence on their uptake by phagocytes (chapter IV). The influence of α 2-human serum glycoprotein (α 2GP) on the phagocytosis of various surface modified MP was studied in DC and was compared with a potent opsonin, IgG, and a dysopsonin, human serum albumin (HSA). The MP were administered to DC before and after the incubation with α 2GP, IgG and HSA in single, binary or ternary protein systems and in whole blood serum. Phagocytosis of MP was vastly affected by the surface character of the MP themselves and by the adsorption of the proteins. Poly-L-lysine (PLL) -modified MP were under all conditions internalized with highest efficiency which is suggested to be mediated by their positive surface charge. The adsorption of commonly phagocytosis promoting proteins reduced the uptake of PLL-modified particles and is explained by compensation of the positive surface charge by the adsorbed negatively charged proteins. In all other particle types tested, freshly adsorbed α 2GP was found to exhibit a strong phagocytosis promoting activity which was comparable to that of adsorbed IgG. Interestingly, this opsonic activity was lost already two hours after adsorption to the particle surface. Protein adsorption from binary and ternary protein systems and from

whole blood serum occurred in a competitive manner. Significant inhibition of phagocytosis was observed, even when HSA was combined with strong opsonins such as α 2GP or IgG or in mixtures of all three proteins, indicating the importance of studying the influence of protein adsorption in protein mixtures.

Zusammenfassung

Phagozytose ermöglicht es, Antigene mit partikulären Trägersystemen elegant in wichtige, antigen-präsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC), einzuschleusen. DC sind jedoch deutlich selektiver in der Phagozytose von partikulärem Material als Makrophagen ($M\Phi$). Daher ist es nötig, die Eigenschaften von Partikeln zu optimieren, um eine effiziente Aufnahme in DC zu erreichen. In der vorliegenden Dissertation geht es daher um geeignete Methoden zur Evaluation der Phagozytose von Partikeln in antigen-präsentierenden Zellen, um den Einfluss der Grösse und Oberflächeneigenschaften von Partikeln, um die Veränderung der Oberflächeneigenschaften und Phagozytose bei Adsorption von Serum Proteinen und um das intrazelluläre Schicksal der Partikel nach der Aufnahme in DC.

Im ersten Kapitel (*chapter 1*) wird in einem Rückblick das Thema Phagozytose von biologischen und synthetischen Partikeln mit möglichen Konsequenzen für die Immunmodulation von DC behandelt. Der Leser wird ausserdem in den komplexen Lebenszyklus und die vielfältigen Funktionen von DC, die eng mit den verschiedenen Stadien der Differenzierung von DC verbunden sind, eingeführt. Weiterhin werden Methoden zur in-vitro Differenzierung von DC vorgestellt und die Phagozytosekapazität dendritischer Zellen mit der von $M\Phi$ verglichen. Im Hinblick auf Phagozytose, Effizienz und Intracellular Trafficking werden die physiko-chemischen Eigenschaften von Partikeln basierend auf dem Mechanismus der Phagozytose und phagosomaler Reifung diskutiert. Sollen

Antigene partikulärer Materialien von DC T-Zellen (cross-)präsentiert werden, so ist die Reifung von DC eine grundlegende Voraussetzung, deren Zusammenhang hier erörtert wird. Schliesslich werden die Überlegungen bezüglich der Entwicklung Trägersystemen für Vakzine zusammengefasst und ein Ausblick auf die Immuntherapie mit DC am Menschen gegeben.

Im zweiten Kapitel (*chapter II*) geht es um das Targeting von professionellen, APC mit Mikropartikeln (MP) als möglichen antigen-tragenden Systemen. Um die Phagozytosekapazität von DC und M Φ beurteilen zu können, wurden diese Zellen mit oberflächen-modifizierten Polystyrol-MP inkubiert. Mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde dabei exakt zwischen phagozytierten, intrazellulären und nicht-phagozytierten, extrazellulären Partikeln unterschieden. In der konventionellen Mikroskopie können besonders positiv geladene Partikel, die gut an der Aussenseite der Zellmembran haften, leicht zur Überbewertung der Phagozytosekapazität führen. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Kombination von Fluoreszenzmikroskopie mit dem Quenchen extrazellulärer Fluoreszenz (hier mit Trypanblau) die exakte Beurteilung der Partikelaufnahme und eignet sich darüberhinaus für ein schnelles Screening von Proben. Mit Hilfe dieser Methoden konnten grosse Unterschiede in der Phagozytose verschiedener MP bei DC und M Φ festgestellt werden; die MP unterschieden sich dabei hinsichtlich Grösse, Oberflächenmaterial und ζ -Potential. Negativ geladene, carboxylierte und BSA-überzogene MP wurden von M Φ in relativ geringem Ausmass phagozytiert; bei DC lag die Phagozytosekapazität für diese MP jedoch nochmals deutlich tiefer. Interessanterweise zeigten positiv geladene, Poly-L-lysin (PLL) überzogene Partikel eine hohe Phagozytosekapazität in beiden Zelltypen. Im Vergleich mit Literaturdaten ziehen wir den Schluss, dass die Phagozytosekapazität von DC und M Φ wesentlich von Grösse und Ladung der MP sowie vom Bulk- und Überzugsmaterial abhängig ist. Mit vergleichbarer Effizienz ist ein Targeting

von PLL-MP in DC und M Φ möglich. Daher kommen diese Partikel als mögliche Träger für Antigene in Frage.

Es wurde gezeigt, dass kationische MP von APC und auch von Zellen mit geringer Phagozytosekapazität wie den DC effizient phagozytiert werden. Im dritten Kapitel (*chapter III*) wurden MP unter der Ausbildung kovalenter Bindungen mit Proteinen und Polyaminen oberflächenmodifiziert. Die Phagozytose dieser hydrophilen, negativ und positiv geladenen Partikel wurde nach Fluoreszenzmarkierung der Partikel und unter Quenching extrazellulärer Fluoreszenz in humanen DC und M Φ beurteilt. Aufgrund der pH-Sensitivität des Fluoreszenzmarkers erlaubt diese Methode die gleichzeitige Bestimmung des pHs in der unmittelbaren intrazellulären Umgebung phagozytierter MP. Kationische MP wurden sehr effizient von DC und M Φ phagozytiert und in einer intrazellulären Umgebung von pH 6,0 bis 6,8 gefunden. Im Gegensatz dazu wurden protein-überzogene Partikel in saurer intrazellulärer Mikroumgebung gefunden und in deutlich geringerem Ausmass mit markanten Unterschieden zwischen DC und M Φ phagozytiert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass kationische MP unter aktiver Ausbildung von zellulären Ausstülpungen phagozytiert und fest von der phagosomalen Membran umschlossen werden. Es wurde vorgeschlagen, dass Phagozytose gemäss dem Zipper-Modell in Kombination mit einer intraphagosomalen Pufferung die Azidifizierung des Phagosoms verzögert. Zusammenfassend sind kationische MP vielversprechende Trägersysteme für ein intrazelluläres Delivery immunmodulierender Therapeutika, die vor lysosomalem Abbau geschützt werden müssen, um ihre volle Aktivität zu behalten.

In Kapitel vier (*chapter IV*) geht es um den Einfluss der Adsorption von Serumproteinen an die Oberfläche von synthetischen, partikulären Arzneistoffträgersystemen auf die Aufnahme in phagozytierende Zellen. Weiter wurde der Einfluss von α 2-Humanserumglycoprotein (α 2GP) auf die

Phagocytose von unterschiedlichen oberflächenmodifizierten MP in DC untersucht und dabei mit IgG als starkem Opsonin sowie Humanserumalbumin (HSA) als Dysopsonin verglichen. Die MP wurden dazu vor und nach der Inkubation mit α 2GP, IgG und HSA in Ein-, Zwei- und Drei-Protein-Systemen sowie in Form von Blutserum zu DC gegeben. Dabei wurde die Phagozytose der MP deutlich sowohl vom Oberflächencharakter der MP als auch durch Adsorption der Proteine beeinflusst. PLL-modifizierte MP wurden unter allen Bedingungen stets mit der höchsten Effizienz phagozytiert, was höchstwahrscheinlich mit ihrer positiven Oberflächenladung zusammenhängt. Die Adsorption herkömmlicher, phagozytose-fördernder Proteine verringerte die Aufnahme PLL-modifizierter MP, was sich durch die Kompensation der positiven Oberflächenladung durch adsorbierte negativ geladene Proteine erklären lässt. Bei allen anderen getesteten Partikelsorten, hatte frisch adsorbiertes α 2GP eine starke phagozytose-fördernde Aktivität, die mit der von adsorbiertem IgG vergleichbar war. Interessanterweise ging diese opsonisierende Aktivität bereits zwei Stunden nach Adsorption an der Partikeloberfläche verloren. Die Adsorption von Zwei- und Drei-Protein-Systemen und von Blutserum erfolgte in kompetitiver Weise. Die Phagozytose wurde signifikant durch die Anwesenheit von HSA in Mischungen mit den an sich starken Opsoninen α 2GP oder IgG oder im Drei-Protein-System blockiert, was die Notwendigkeit, den Einfluss der Proteinadsorption in Proteingemischen zu untersuchen, verdeutlicht.