

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Julie Kadlecová

Peptidy penetrující buněčné membrány - úskalí uvěznění v endosomu a jeho překonání

Cell-penetrating peptides - pitfall of endosomal entrapment and its overcoming

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Jana Váňová

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.5.2018

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Janě Váňové za cenné rady, neutuchající podporu, a hlavně trpělivost při vzniku této práce. Ráda bych také poděkovala své rodině i přátelům za povzbuzení a psychickou podporu.

Abstrakt

Cílem této práce je představit peptidy penetrující membránu (PPM) jako potenciální způsob dopravy látek do buňky. To je demonstrováno jejich schopností prostupovat buněčné membrány s připojeným nákladem. Struktura a sekvence těchto peptidů, na nichž je postavena jejich unikátní vlastnost penetrovat buněčnými membránami, je popisována vzhledem k různým způsobům dopravy. Úskalím internalizace těchto PPM endocytózou je časté uvěznění peptidu i s navázaným nákladem v endozomu. Pokud se tak stane, obsah endozomu je degradován a PPM i s nákladem se neuvolní do cytosolu nebo jádra, jejich cílového působiště. Tato práce se věnuje kreativním možnostem, které by únik PPM i s nákladem usnadnily. Zavedení takto upravených PPM by urychlilo jejich použití v klinické medicíně a umožnilo tak léčbu i takových chorob, jako je nádorové bujení nebo nemocí stávajících se rezistentními proti antibiotikům.

Klíčová slova: peptidy penetrující membrány, PPM, penetrace, endocytóza, únik z endozomu, internalizace, doprava látek do buněk

Abstract

The aim of the thesis is to introduce cell penetrating peptides as a potential way of transporting cargo into cells. Their ability to penetrate cell membranes with attached cargo is demonstrated. The structure and sequences of these peptides, on which their unique property to penetrate through the cell membranes is built, are described with respect to the different modes of transport. The difficulty of internalizing these CPPs via endocytosis is the frequent trapping of peptide with attached cargo in the endosome. If this occurs, the endosome content is degraded and the CPP with attached cargo is not released into the cytosol or nucleus, their target site. This work focuses on creative options, how to make release from endosome easier for CPPs with attached cargo. The introduction of such modified CPPs would accelerate their use in clinical medicine to enable the treatment of diseases such as cancer or antibiotic-resistant diseases.

Key words: cell penetrating peptides, CPPs, penetration, endosomal escape, internalization, cargo delivery into cells

Obsah

Úvod.....	1
Peptidy penetrující membrány	2
Klasifikace	3
Kationické PPM.....	3
Amfipatické PPM	4
Primárně amfipatické PPM (paPPM).....	4
Sekundárně amfipatické PPM (saPPM).....	5
Internalizace PPM do buněk	6
Přímá translokace.....	7
Endocytóza	9
Internalizace kationických PPM.....	11
Internalizace amfipatických PPM.....	12
Internalizace primárně amfipatických PPM	12
Internalizace sekundárně amfipatické PPM	14
Možnosti úniku PPM z endozomů a konkrétní příklady.....	15
Zabudování pH citlivých domén	15
Maskování pH citlivou doménou v cílení na nádorové buňky	16
Zavedení fúzogenních peptidů	18
Akumulace pozitivního náboje.....	20
Vliv značení fluorofory	21
Využití fotochemické indukce.....	22
Využití domén schopných uniknout z endozomu.....	24
Srovnání vlastností za sjednocených podmínek	25
Závěr	27
Seznam použité literatury.....	28

Seznam použitých zkratk

(Arg)₉		nonarginin
μM		mikromolární
AK		aminokyselina
Anti-BMP		monoklonální protilátky proti BMP
ARF		peptid z N-koncové části tumorsupresoru 14ARF
Asp19		kyselina asparagová na 19. místě v sekvenci
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
Av		avidin
Bac-7	bactenecin 7	bactenecin 7
BMP	bis(monoacylglycero)phosphate	bis(monoacylglycerol)fosfát
C-5H-Tat-5H-C		Tat peptid obklopený z obou stran 5 histidiny a jedním cysteinem
CPPs	cell penetrating peptides	buňku penetrující peptidy
CPZ	chlorpromazine	chlorpromazin
CQ	chloroquine	chlorochin
Cre-loxP		systém rekombinace mezi dvěma loxP místy pomocí Cre rekombinázy
D-AK		D optický izomer aminokyseliny
dfTAT		dimerní fluorescenční Tat peptid
DLS	dynamic light scattering	dynamický rozptyl světla
EEDs	endosomal escape domains	domény schopné úniku z endozomu
EGFP	enhanced green fluorescent protein	zesílený zelený fluorescenční protein
FAM	fluorescein amidit	
FS		fotosensibilizátor
GAG	glycosaminoglycan	glykosaminoglykan
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
GFPβ11-(S-S)-TAT-PEG6-GWWG(EED)		fragment peptidu GFP spojen sulfidovými můstky s peptidem Tat přes 6 jednotek polyethylenglykolu a sekvenci tryptofanu a

		glycinu k EED doméně
GFPβ11		fragment peptidu GFP, po vazbě na GFP β 1-10 schopen fluorescence
GFPβ1-10		fragment peptidu GFP, po splynutí s GFP β 11 utvoří plnohodnotné GFP
Glu15		kyselina glutamová na 15. místě v sekvenci
GST		enzym glutathion-S-transferasa
GTPáza		enzym hydrolyzující guanosin trifosfát
HA2		hemagglutinin 2
HE		histidin-glutamát
HeLa		buněčná linie odvozená od karcinomu děložního čípku Henrietty Lacksové
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HS		heparan sulfát
I-GST-HE-MAP		komplex glutathion-S-transferasy s histidin-glutamátem a peptidem MAP
IR800-GST-HE-MAP		komplex glutathion-S-transferázy s histidin-glutamátem připojený k MAP peptidu značený fluoroforem IR800
IR800-HE-GST		komplex histidin-glutamátu s glutathion-S-transferázou značený fluoroforem IR800
IR800-MAP-GST		komplex MAP peptidu s glutathion-S-transferázou značený fluoroforem IR800
L-AK		L optický izomer aminokyseliny
MAP	model amphipatic peptide	modelový amfipatický peptid
MAPKAP kinázy II	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	mitogenem aktivovaná proteinkináza aktivovaná protein kináza 2
Mβ-CD	methyl- β -cyclodextrin	methyl- β -cyklodextrin
N/P	nitrogen to phosphate ratio	podíl dusíku na fosfát v DNA
NA		neutravidin
NLS	nuclear localization signal	jaderný lokalizační signál
nm		nanometr

NYS		nystatin
pANT		peptid izolovaný z homeoproteinu pANT <i>Drosophily melanogaster</i> , označovaný jako penetratin
pANT_{RhB}		konjugát rhodaminu B s penetratinem
pANT_{MCA}		konjugát 7-methoxycoumarin-4-yl kyseliny octové s penetratinem
pANT_{PBA}		konjugát kyseliny 1-pyren máselné s penetratinem
paPPM		primárně amfipatické PPM
pDNA		plasmidová DNA
PEG	polyethylenglycol	polyethylenglykol
PHP		polyhistidinové peptidy
PPM		peptidy penetrující membrány
Pr		promotor
PTDs	protein transduction domanis	proteinové transdukční domény
pVEC	peptide from murine Vascular endothelial-cadherin protein	peptid izolovaný z myšního endoteliálního cévního kadherinu
Rac1		malá GTPáza z Rho/Rac skupiny
RhoA		malá GTPáza z Rho/Rac skupiny
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
SA		streptavidin
saPPM		sekundárně amfipatické PPM
siRNA	silencing RNA	umlčující sekvence RNA
SLBs	supported lipid bilayers	lipidové dvojvrstvy na pevném podkladu
SV 40	simian virus 40	opičí virus 40
Tat-10H		sekvence 10 histidinů připojených k Tat peptidu
TP10		transportan 10 z galeninu a mastoparanu
TP10b		transportan 10 biotinylován na N-konci

Úvod

Viry jsou vnitrobuněčné parazitické organismy, jež jsou v povědomí společnosti příčinou mnoha lidských chorob. Právě jejich záporná vlastnost proniknout do buněk a zahájit vlastní genovou expresi byla původní inspirací pro studium peptidů penetrujících membrány (PPM, z anglického cell penetrating peptides; CPPs). Tyto peptidy mohou být odvozené od výše zmíněných virů, ale také od buněčných proteinů schopných pronikat membránami, případně mohou být synteticky vyrobené. Zpravidla se jedná o krátké, nabitě domény uzpůsobené k penetraci plazmatickou membránou do buňky a dále na jejich místo působení. Tuto schopnost jim umožňuje jejich struktura i složení sekvence. Po zjištění, že tyto domény jsou schopny nescificky penetrovat do eukaryotických buněk se začaly intenzivně zkoumat možnosti připojení látek k těmto peptidům, jež by mohly například opravit defekty v poškozených buňkách. Látky dopravované tímto způsobem tvoří pestrou škálu, může se jednat o peptidy, nukleové kyseliny i nanočástice a lze také volit způsob připojení látky k PPM. Způsoby penetrace PPM do buněk se liší, většina jich využívá jako hlavní mechanismus dopravy endocytózu. Když je tento komplex PPM s dopravovanou látkou pohlcen buňkou, vyvstává problém, jak ho posléze uvolnit z endozomu, ve kterém je povětšinou následně uvězněn. Endozom je i s obsahem totiž směřován k degradaci, aniž by bylo dopravovanému terapeutiku umožněno projevit své léčebné schopnosti.

Cílem této práce je na základě dostupné literatury charakterizovat vstup PPM do buňky a popsat přístupy, jež by podpořily jeho únik z endosomu v souvislosti dopravy možných terapeutik do buňky. Proto bude dále rozveden vliv sekvence a struktury peptidů na jejich internalizaci do buňky. Poté budou popsány možnosti, jež by v budoucnu mohly umožnit bezproblémový únik PPM s nepoškozeným nákladem do cytoplasmy nebo do jádra, kde může dopravovaný náklad využít svůj léčebný potenciál.

Peptidy penetrující membrány

Plazmatická membrána je nezbytnou součástí každé eukaryotické buňky, jelikož odděluje vnitřní prostředí od vnějšího a v důsledku toho je buňka schopna zvýšit uspořádanost svého systému. Kromě stavební, ochranné, signalizační a adhezní funkce funguje jako selektivní síto pro molekuly vstupující i vystupující z buňky. Povaha plazmatické membrány dovoluje energeticky nezávislý průchod zejména látkám malým a hydrofobním. Ostatní molekuly s nábojem, velkého objemu nebo špatně rozpustné jsou nuceny použít transmembránové přenašeče.

Právě tyto látky, pro které je plazmatická membrána za standardních podmínek nepropustná, mohou využít potenciálu peptidů penetrujících membrány PPM (z anglického cell penetrating peptides, -CPPs). V literatuře je možné se setkat i s označením proteinové transdukční domény, -PTDs (z anglického protein transduction domains), které lze v tomto kontextu chápat jako specifické sekvence schopné přenosu biologického materiálu přes membránu buňky. Obecně se jedná o krátké bazické peptidy (10-30 AK – aminokyselin) s vysokým obsahem argininu a/nebo lysinu, které disponují vlastností pronikat membránami (i vnitrobuněčnými) a je možné na ně kovalentními nebo nekovalentními vazbami připojit různorodé makromolekuly.

V roce 1987, kdy byl objeven první z těchto peptidů – substance P (Repke a Bienert, 1987), se tyto rozsáhle využitelné přenašeče staly středem zájmu farmaceutického i medicínského výzkumu. Dalším identifikovaným PPM byl fragment proteinu Tat, který plní u viru HIV-1 (z anglického Human Immunodeficiency Virus 1) funkci transaktivátoru transkripce, regulátoru exprese genů. (Frankel a Pabo, 1988). Posléze byl izolován šestnáct aminokyselin dlouhý peptid homeoproteinu pANT izolovaný z *Drosophily melanogaster*, označovaný jako penetratin (Derossi a kol., 1994).

Mezi společné vlastnosti a přední výhody PPM patří nízká toxicita (z důvodu jejich rozkladu v buňce na aminokyseliny) a efektivní internalizace i za nízké koncentrace. Tyto přednosti jsou vykoupeny nízkou specificitou při rozeznávání buněk i tkání a jejich problematické uvolnění z vnitrobuněčných váčků (shrnutí Durzyńska a kol., 2015; Reissmann, 2014).

Díky svým vlastnostem vázat a přepravit široké spektrum makromolekul, jako jsou ribonukleové kyseliny, peptidy, proteiny, léčiva či nanočástice, jsou perspektivními kandidáty pro léčbu zejména geneticky podmíněných chorob a nádorových onemocnění. Schopnost těchto peptidů prostoupit hematoencefalickou bariérou, by mohla dokonce umožnit cílení na nervové buňky (Falanga a kol., 2015; Reissmann, 2014). Z těchto atraktivních možností využití je snadné vyvodit důležitost obeznámení se se specifickými vlastnostmi pro určité skupiny peptidů a způsobem, jakým tyto vlastnosti souvisejí s jejich začleněním do membrán.

Klasifikace

V kontextu předchozí kapitoly je klasifikace PPM uzpůsobena do dvou skupin na základě fyzikálně-chemických vlastností a schopností peptidů vázat lipidy. Positivně nabitě PPM výrazně početně převažují, existují totiž i záporně nabitě, které nemají samostatně pojmenovanou skupinu. Největší rozsah zaujímají amfipatické PPM a minoritní skupinu tvoří hydrofobní PPM, o kterých dosud není mnoho známo, a proto se jim práce nebude podrobněji věnovat. Rozdělení je následující:

Kationické PPM

Ve velké míře se jedná o peptidy odvozené od Tat proteinu a peptidy s vysokým obsahem bazických aminokyselin, jako je arginin, lysin, histidin (shrnutí v Milletti, 2012). Právě fragment peptidu Tat, jež plní funkci transkripčního aktivátoru u viru HIV-1, byl jedním z prvních izolovaných peptidů s penetračními schopnostmi (Green a kol., 1989).

U kladně nabitých PPM hraje podstatnou roli kvantitativní zastoupení bazických aminokyselin. Vyšší koncentrace argininu přímo korelovala s vyšším počtem internalizovaných PPM. Zároveň acylace těchto kationických PPM za účelem zvýšit jejich hydrofobicitu, je způsob jak vyvolat jejich penetraci do buňky (Avrahami a Shai, 2003; Madani a kol., 2011). Bylo prokázáno, že k maximální internalizaci dochází při počtu 6 až 8 argininů (Futaki a kol., 2001). V souvislosti s tímto zjištěním se ukázalo, že guanidinová funkční skupina na argininu je zodpovědná za dvojvazné vodíkové můstky napojené na aniontové části plazmatické membrány. Tuto vlastnost lysin postrádá, proto není vhodnou AK do pozitivně nabitých PPM (Rothbard a kol., 2004) (konkrétně neobsahuje guanidin, tudíž s membránou netvoří vazby tohoto typu (Koren a Torchilin, 2012)). I ostatní AK ovšem mají na internalizaci do buňky vliv. Takový příklad lze demonstrovat u peptidu zvaného penetratin, který při záměně aminokyseliny v sekvenci, konkrétně fenylalaninu namísto tryptofanu, ztrácí svoji vlastnost prostoupit membránou (Prochiantz, 1996).

Schopnost kationických PPM téměř nepodmíněného vstupu do buňky zapříčiňuje toxicitu způsobenou nadměrným děravěním membrány, která je tak vyšší v porovnání s amfipatickými PPM. V souvislosti s touto vlastností dochází k rychlému vymytí pozitivně nabitých PPM z krve, což znesnadňuje jejich klinické použití (Durzyńska a kol., 2015).

Polyhistidinové peptidy (PHP) jsou závislé na pH, jelikož disociační konstanta histidinu odpovídá 6. V praxi se to projeví tak, že za nízkého pH je histidin kladně nabitý a plní tedy funkci PPM, ovšem za fyziologického pH má neutrální náboj. Bylo pozorováno, že množství histidinů přímo korespondovalo s větší efektivitou vstupu těchto PPM do buňky (Iwasaki a kol., 2015). Projevíly také větší kapacitu při dopravování „nákladu“ do savčích buněk než vykazuje oktaarginin (Iwasaki a kol., 2015). Z tohoto důvodu se dají využít k penetraci do nádorových buněk - nádorové mikroprostředí má

totiž v důsledku nízkého oxysličování kyselý charakter (Engin a kol., 1995; Jähde a kol., 1982; McCoy a kol., 1995).

Specifickou třídou peptidů s kladným nábojem jsou peptidy obsahující NLS (jaderný lokalizační signál). Jedná se o krátké peptidy často obsahující arginin, lysin nebo prolin (shrnuo v Milletti, 2012). V roli PPM jsou schopné dopravit do jádra náklad skrz jaderné póry (Guidotti a kol., 2017). Bohužel ve většině NLS je počet pozitivních nábojů nižší než 8, tudíž jejich absorbování není příliš efektivní a nejsou vhodné pro samostatné použití (Mueller a kol., 2008). Řešením se jeví kovalentní připojení NLS k hydrofobní peptidové sekvenci s cílem vytvořit plnohodnotné amfipatické PPM.

Amfipatické PPM

Pojmem amfipatický označujeme takový peptid, který má jak hydrofilní, tak hydrofobní část. Hydrofobní část tvoří nepolární AK jako je leucin, izoleucin, alanin a valin. Polární AK zastupuje povětšinou lysin a/nebo arginin (Zaro a Shen, 2015). Tyto vlastnosti jsou velmi žádoucí, protože většina biologických membrán je na povrchu negativně nabitá díky fosfátům obsaženým ve fosfolipidech, zatímco uvnitř membrán je spíše neutrální náboj. (Gennis, 2013).

Primárně amfipatické PPM (paPPM)

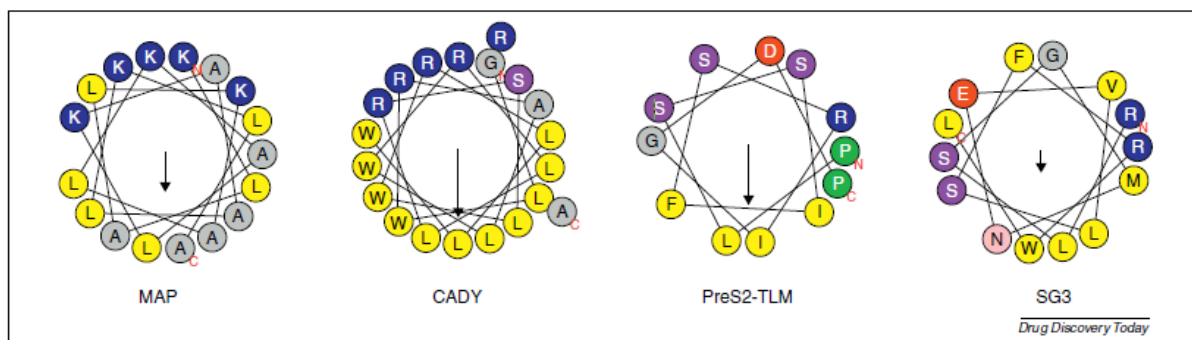
Obecně délka jejich sekvence přesahuje 20 AK. Jejich společnou vlastností je, že se skládají z hydrofobní i hydrofilní části, jsou tedy schopné interagovat s nenabitými (nepolárními) i záporně nabitými membránami (Ziegler, 2008). K začlenění do lipidové dvojvrstvy využívají hydrofobních interakcí na rozdíl od pozitivně nabitých PPM, za přítomnosti aniontových fosfolipidů je jejich afinita ještě navýšena. (Henriques a Castanho, 2005; Yandek a kol., 2007, 2008).

Mohli bychom je dále specifikovat na peptidy odvozené od přirozeně se vyskytujících proteinů a chimerické peptidy. Pojem chiméra lze velmi stroze vysvětlit jako jeden celek složený ze dvou cizorodých částí (ze dvou částí odlišného původu). Ve spojení s PPM tak označujeme peptid složený například z hydrofobní sekvence kovalentně připojené k NLS. Obě tyto části jsou rozděleny linkerem (krátkým úsekem AK). Například chimerické peptidy MPG a Pep-1 mají oba NLS z SV 40 (opičí polyomavirus). U MPG je hydrofobní doména získaná z HIV glykoproteinu 41, ale v případě Pep-1 ji tvoří oblast bohatá na tryptofan vyznačující se vysokou afinitou k membránám (Milletti, 2012; Nguyen a kol., 2018). Dalším významným peptidem je transportan 10, vzniklý spojením fragmentu galaninu (neuropeptid) a sekvence mastoparanu (toxin izolovaný z vosího jedu) přes aminokyselinu lysinu (Dunkin a kol., 2011; Soomets a kol., 2000).

Peptidy odvozené od přirozeně se vyskytujících proteinů zastupuje například pVEC z myšního endoteliálního cévního kadherinu (transmembránový protein, sloužící k vytváření mezibuněčných spojů) nebo ARF z N-koncové části tumor supresoru 14ARF (Nguyen a kol., 2018).

Sekundárně amfipatické PPM (saPPM)

Zpravidla obsahují méně aminokyselin než primárně amfipatické PPM. Zaujímají specifické struktury jako je α helix nebo β list a v těchto konformacích se váží na buněčnou membránu. Konkrétně motiv α helixu je velmi oblíbený při navazování na membránu. V α helixu se odděleně vyskytují silně hydrofobní a hydrofilní část. Toto uspořádání je zobrazeno na obr. č.1.



Obr.č.1.: Znázornění nerovnoměrného rozmístění hydrofobních a hydrofilních aminokyselin ve struktuře α helixu. Aminokyseliny jsou obarveny následovně: žlutá – hydrofobní, šedá – apolární, fialová – polární, modrá – pozitivně nabitě, červená – negativně nabitě, zelená – prolin (převzato z Milletti, 2012)

Příkladem mohou být peptidy MAP (modelový amfipatický peptid), či CADY. Pro syntézu CADY peptidu byl použit PPTG1 (Rittner a kol., 2002) jako templát, jedná se o chimerický peptid získaný z fúzního peptidu JTS1 (Gottschalk a kol., 1996). CADY se následně upravil přidáním aromatického tryptofanu a pozitivně nabitého argininu za účelem efektivnější translokace siRNA (z anglického small interfering RNA, popřípadě silencing RNA - umlčující sekvence RNA, která se naváže na mRNA a znemožní její překlad) a menších oligonukleotidů (Crombez a kol., 2009). Právě u MAP je díky obsahu lysinu a α helixu podpořena vysoká míra endocytózy (Scheller a kol., 1999). Ačkoliv postrádá typickou NLS byla u něj pozorována schopnost translokovat se do buněčného jádra, což je vlastnost, jež stojí za bližší zkoumání (Kenien a kol., 2012).

Mohou vytvořit i β list jehož navázání na membránu probíhá obdobně jako u α helixu. Tato konformace má obdobné nevýhody jako α helix, pokud je v sekundární struktuře mutace, dochází k inhibici internalizace. Konkrétně u VT5, pokud byly L-AK nahrazeny za D-AK, byla tak inhibována jeho schopnost tvořit β list, což je zásadní pro efektivní absorbování (Oehlke a kol., 1997). L-AK a D-AK jsou optické izomery vznikající odlišným uspořádáním skupin na chirálním uhlíku,

v proteinogenních AK se vyskytují pouze L-izomery. AA3H je saPPM získaný z N-koncové sekvence annexinu, který se též začal využívat jako vektor pro dopravu molekul do buňky (Young Kim a kol., 2015). Nejprve byla tato schopnost zjištěna zavedením β galaktosidázy do buňky, poté byla jeho role potvrzena dopravou Cre rekombinasou (Young Kim a kol., 2015).

Amfipatické peptidy bohaté na prolin, který má schopnost zaujmout konformaci pyrrolidinového kruhu, disponují jedinečnými vlastnostmi. Kupříkladu terciární dusík v pyrrolidinovém kruhu není schopen se účastnit na tvorbě vodíkových můstků. V čisté vodě takové peptidy zaujímají specifickou strukturu, rigidní templát, polyprolin II, jež vypadá jako levotočivý helix s třemi aminokyselinami na otáčku oproti standardnímu pravotočivému helixu - znázorněno na obr. č. 2 (Fillon a kol., 2005; Geisler a Chmielewski, 2007). Tyto vlastnosti lze demonstrovat na fragmentu antimikrobiálního peptidu Baktenečinu-7 (Bac-7, z anglického Bactenecin-7). K tomuto synteticky vyrobenému fragmentu byla připojena sekvence deseti prolinů a dvou argininů, tento komplex byl posléze schopen dopravovat nekovalentně vázaný proteinový náklad (neutravidin) do cytoplasmy i do jádra (Sadler a kol., 2002).



Obr. č. 2.: Model polyprolinového helixu se zvýrazněnými hydrofobními (fialově) a pozitivně nabitými (modře) aminokyselinami (převzato a upraveno z Geisler a Chmielewski, 2007).

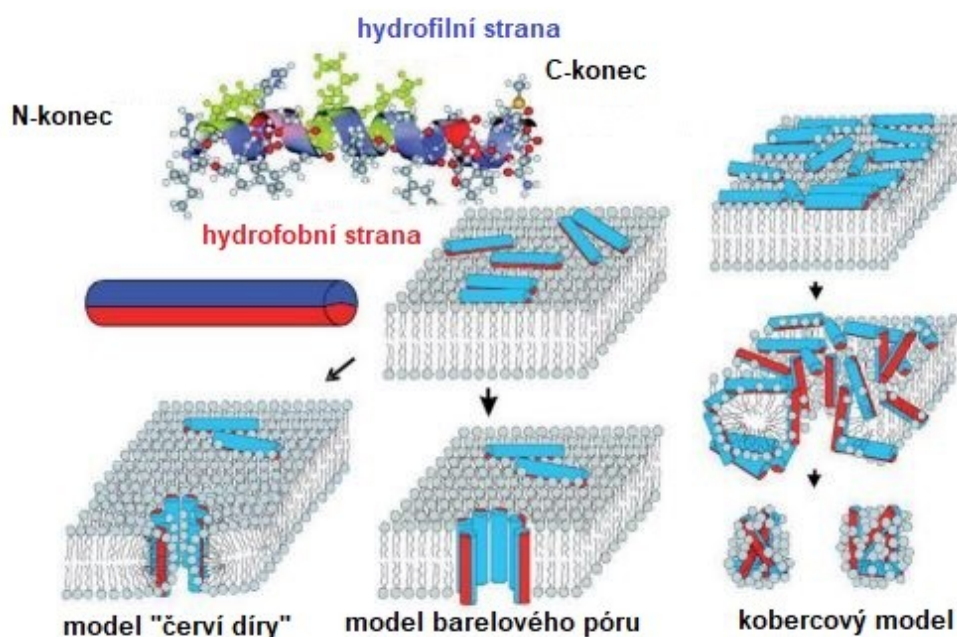
Internalizace PPM do buněk

Molekuly, jež k proniknutí do buňky nepoužívají specifické přenašeče nebo pumpy mají stále mnoho možností, jak se do buněk začlenit. Může se jednat o energeticky náročný proces nebo proces zcela soběstačný, na energii nezávislý. Na povrchu buňky mohou být receptory rozpoznávající konkrétní molekuly, které usnadní jejich vychytávání. Nejčastěji využívané způsoby transportu jsou endocytóza (včetně jejich variací) a přímá translokace. Ačkoliv se tyto metody vstupu do buněk intenzivně studovaly, byly získány rozporuplné výsledky. Tedy nelze s obecnou platností tvrdit, pro jaké PPM jsou charakteristické konkrétní mechanismy internalizace. Je to způsobeno množstvím proměnných, jako je například povaha nákladu, který chceme pomocí PPM dopravit do buňky, velikost komplexu PPM s tímto nákladem, vazba spojující náklad s peptidem, koncentrací PPM (shrnuto v Guidotti a kol., 2017).

Byly však získány poznatky, které mohou usměrnit další bádání. Například pokud se jedná o přímou translokaci dochází, k ní většinou v případech, kdy je PPM ve vysoké koncentraci (Fretz a kol., 2007; Kosuge a kol., 2008). U většiny PPM i jejich komplexů s nákladem však byla zjištěna endocytza jako majoritní způsob dopravy do buňky (Hirose a kol., 2012; Lundberg a kol., 2003; Palm-Apergi a kol., 2012).

Přímá translokace

Transport pomocí přímé translokace má řadu výhod. Tento proces nevyžaduje přísun energie, funguje i za nízkých teplot, není ohrožen inhibitory endocytóz, ani není potřeba molekul sloužících jako receptory (shrnuto v Borrelli a kol., 2018; Guidotti a kol., 2017). Při tomto druhu transportu dochází k nashromáždění PPM v takzvaných nukleačních zónách. Zde je iniciováno uvolňování ceramidu ze sfingomyelinu (hojně zastoupeného fosfolipidu v membránách) procesem hydrolyzy za působení kyselého enzymu sfingomyelinasy (Hirose a kol., 2012; Schmidt a kol., 2016; Verdurmen a Brock, 2011). Tímto způsobem dochází k narušení membrány. Obecně se přímá translokace zakládá na interakci záporně nabitých komponent fosfolipidové membrány s pozitivně nabitou částí PPM. Takový děj vede k destabilizaci membrány nebo přechodně navozuje tvorbu pórů. Tvorba pórů může mít podobu toroidních pórů nebo barelových pórů, jak je znázorněno na obr. č. 3.



Obr. č. 3.: Znázornění tvorby pórů a destabilizace membrány pomocí kobercového modelu. Nahoře vlevo vidíme amfipatický α helix a rozložení hydrofobních (červených) a hydrofilních (modrých) aminokyselin. Ve středu obrázku je zobrazen způsob vazby amfipatických PPM na membránu. Hydrofobní část PPM se navazuje interakcí s hydrofobním vnitřkem membrány a v důsledku toho vznikají různé variace rozrušení membrány. Dole vlevo je model „červí díry“ (toroidní pór), ve středu

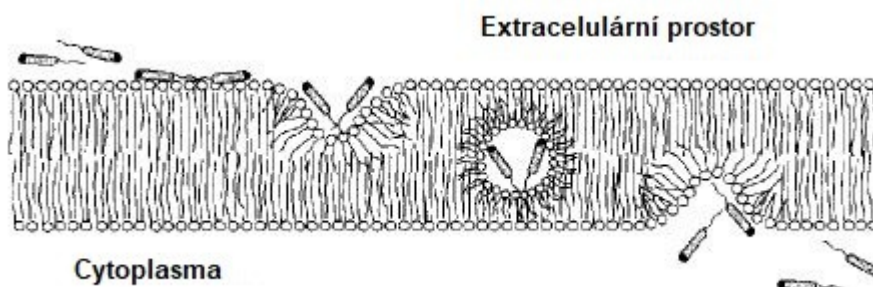
dole je znázorněn barelový pór. Vpravo dole je koberecový model destabilizace membrány (převzato a upraveno z Giuliani a kol., 2008).

Pokud se jedná o toroidní póry mohou nabývat aktivního a deaktivovaného stavu. Pro přechod jednoho stavu do druhého je rozhodující koncentrace peptidu. Za nízké koncentrace je peptid rozmístěn rovnoběžně podél membrány, po zvýšení jeho koncentrace zaujme PPM kolmé postavení k membráně (zkříví se) a to určuje jeho aktivní stav. Následně PPM za tvorby přechodného póru penetruje do hydrofobní oblasti fosfolipidové dvojvrstvy a vstupuje do cytosolu (Herce a Garcia, 2007; Herce a kol., 2009; Menestrina a Sera, 2005).

V případě β barelů peptidy zaujmou α helikální strukturu v membráně. Hydrofilní části peptidu tvoří vnitřní prostředí póru a to umožní vstup hydrofilním částem PPM viz obr. č. 3. (Järver a kol., 2010).

Bylo pozorováno i několik translokačních mechanismů navozením destabilizace membrány. Například koberecový model, při kterém dochází k elektrostatickým interakcím mezi pozitivně nabitými peptidy a negativně nabitou membránou, jak je vidno na obr. č. 3. Tato situace nastává taktéž po překročení kritické koncentrace peptidů. Nejdříve se PPM napojí na fosfolipidovou membránu, pokryjí ji jako koberec. Zarovnají se k povrchu tak, že hydrofilní části PPM jsou natočené k fosfolipidům buněčné membrány. Následuje rotace, která má za následek přeorientování hydrofobních zbytků peptidu k hydrofobnímu jádru membrány. Dochází k dezintegraci membrány v důsledku narušení zakřivení dvojvrstvy. Vznikají micely i otvory, kterými mohou procházet nízkomolekulární látky. (Alves a kol., 2008; Shai, 1999; Thennarasu a kol., 2010).

Posledním modelem používaným PPM k přímé translokaci jsou invertované micelové agregáty. Tento způsob dopravy je založen na invaginaci fosfolipidové dvojvrstvy za tvorby invertovaných micel s PPM uvnitř viz obr. č. 4. Jakmile vstoupí micela do cytosolu, PPM je pak uvolněn inverzí (Derossi a kol., 1998).



Obr. č. 4.: Model penetrace peptidu pANT pomocí invertovaných micel. Peptid se váže na negativně nabitě fosfolipidy membrány. To způsobí destabilizaci membrány a putování PPM skrz membránu

uvnitř vytvořené invertované micely. Nakonec je uvolněn do cytoplasmy (převzato a upraveno z Derossi a kol., 1998).

Ovšem tyto způsoby internalizace vyžadují, aby PPM vykazovaly amfipatickou sekundární strukturu α helixu (Ye a kol., 2016).

Následně několik studií dokázalo, že považování přímé translokace jako majoritního způsobu vstupu PPM do buňky bylo přeceňováno. Tento omyl byl způsoben rozličnými podmínkami při experimentech, zejména fixací buněk. Fixace formaldehydem i v malém množství způsobila kumulaci Tat peptidu v jádře, jelikož použití formaldehydu narušilo povrch plazmatické membrány, peptidy tak mohly snáze penetrovat jádra, kde se pravděpodobně s velkou afinitou navázaly na záporně nabitě nukleové kyseliny. Tudíž tyto buňky nevěrohodně simulovaly reálné prostředí v živých organismech (Richard a kol., 2003; Vives a kol., 2003). Přístupy aplikované ve studiích byly tedy přehodnoceny, a poté se potvrdila hlavní role endocytózy jako vstupního mechanismu pro většinu PPM (Richard a kol., 2003).

Endocytóza

Endocytóza je jev vyskytující se ve všech živých buňkách, za účelem dopravy různorodých částic do buňky. Souhrnný název popisuje i další podtypy jako je makropinocytóza a klatrinem nebo kaveolinem zprostředkovaná endocytóza (Borrelli a kol., 2018).

Makropinocytóza se uskutečňuje tak, že se kolem dané molekuly vytvoří z membrány činností aktinových vláken panožky. Tato lamellipodia obklíčí náklad a po opětovném spojení s membránou vytvoří velký endozomální váček.

Při klatrinové endocytóze se shromažďují molekuly klatrinu pod endocytovanou molekulou na vnitřní straně buněčné membrány. Po invaginaci se utvoří kolem váčku plášť z klatrinu, který je však pouze dočasný. Takto vzniklý časný endozom, maturuje generováním kyselého prostředí uvnitř váčku. Pozdní endozom následně splyne s primárním lysozomem, kde je obsah endozomu degradován lysozomálními hydrolázami (Hofmann a Falquet, 2001; Mousavi a kol., 2004).

Kaveolinem zprostředkovaná endocytóza začíná též invaginací membrány. Endocytovaná částice je navázána na membránu, která je invaginována v kaveole připomínající tvar baňky. Na kaveolu jsou napojené aktinové elementy. Tato vazba vyvolává fosforylaci tyrosinu, a poté depolymeraci aktinových prvků. Vytvoří se aktinová záplata a dynamin (GTPáza umožňující odškrcení váčku) řídí polymeraci aktinu na této záplatě. Váčky se v důsledku tohoto děje oddělují do cytosolu (Pelkmans a Helenius, 2002).

Pro endocytosu PPM platí shodná pravidla, tedy jedná se o děj, který rovněž vyžaduje energii. Důkazem budiž experiment, při kterém byl vstup PPM (Tat peptid, VP22, polyarginin a polylysin) při

4 °C silně inhibován (Lundberg a kol., 2003). Taktéž inkubace s deoxyglukosou a azidem sodným, za účelem snížení obsahu ATP v buňce, potvrdila nižší vychytávání těchto PPM (Richard a kol., 2005).

První kontakt mezi PPM a buňkou nastává elektrostatickými interakcemi mezi pozitivně nabitými částmi (zejména kationických) PPM a záporně nabitou membránou. Záporný charakter udávají ve vnější membráně všudypřítomné proteoglykany, jejichž sacharidovou složku tvoří především glykosaminoglykany (GAG) jako je heparan sulfát (HS), heparin a chondroitin sulfát B. Při interakci PPM s GAG dochází k aktivaci GTPáz (RhoA a Rac1), v důsledku čehož se reorganizuje aktinová síť, zvyšuje se fluidita membrány (Conner a Schmid, 2003; Eitzen, 2003) a následně se formují lamellipodia (Gerbal-Chaloin a kol., 2007; Ziegler, 2008).

Za receptorem zprostředkovanou endocytózu se považuje situace, kdy po interakci buněčného receptoru s molekulou je spuštěna signalizační kaskáda vedoucí k pohlcení dané molekula. V této situaci lze plnit heparan sulfát funkci receptoru pro polyargininové PPM (Kawaguchi a kol., 2016; Madani a kol., 2011). Bylo však zjištěno, že tato afinita nemá přímý vliv na internalizaci PPM do buňky (Favretto a kol., 2014). To bylo ověřeno pokusem, během kterého byly PPM obsahující vysoký podíl argininu internalizovány do buňky i za absence GAG (Åmand a kol., 2012).

Taktéž chiralita jednotlivých AK vyskytujících se v PPM může ovlivnit samotný proces endocytózy. Pokud byly přítomny L-aminokyseliny, byla zjištěna efektivnější internalizace do buňky než u D-enantiomerů, ovšem pouze v případě shodné afinity pro heparan sulfát (Verdurmen a kol., 2011). Naopak výhodou D-aminokyselin je oproti jejich L-formám vyšší stabilita proti působení vnitrobuněčných proteáz (Järver a kol., 2010; Verdurmen a kol., 2011). Domnívám se, že to je způsobené specifickým rozeznáváním proteáz - D-aminokyseliny se liší natolik od L-formy, že je proteázy nepovažují za substrát ke štěpení.

K ověření a dalšímu zkoumání vlastností endocytózy jako způsobu dopravy PPM lze dále využít působení endocytických inhibitorů. Použitými byly například chlorpromazine (CPZ), který inhibuje klatrinem podmíněnou endocytózu. Chlorochin (CQ) jež plní funkci disruptoru endozomů a lysozomů. Methyl- β -cyklodextrin (M β -CD) a nystatin (NYS), které narušují kaveolovou endocytózu. Dále byly zkoumány účinky dynasoru, inhibitoru dynaminu a inhibitoru makropinocytózy (5-(N-ethyl-N-isopropyl) amilorid) (Young Kim a kol., 2015).

Významná část endocyticky transportovaných molekul směřuje k degradaci snižujícím se pH v endozomu a hydrolytickými enzymy uvnitř primárního lysozomu. V tomto buněčném kompartmentu jsou rozštěpeny pomocí lysozomálních hydroláz za účelem ochrany buňky proti potenciálním patogenům. Endozomální sekvence PPM snižuje množství transportovaných molekul v cytoplazmě, což je hlavní překážka při jejich klinickém použití (Gillmeister a kol., 2011). Návrhy k vyřešení této překážky budou rozvedeny v poslední kapitole.

Internalizace kationických PPM

Před samotnou internalizací hrají významnou roli elektrostatické interakce mezi kladně nabitými PPM a záporně nabitými buněčnými glykoproteiny. Vysoký obsah AK jako je arginin v těchto peptidech umožňuje vazbu elektrostatickými interakcemi prostřednictvím guanidinových skupin s fosfátovými nebo sulfátovými skupinami na povrchu buňky (Koren a Torchilin, 2012). I pro tuto skupinu PPM byla za nejčastější způsob transportu nejdříve považována přímá translokace (Prochiantz, 2000). To bylo způsobené rozličnými podmínkami při zkoumání internalizace PPM.

Pro tuto třídu peptidů byl přelomový experiment, jenž uskutečnil v roce 2007 Duchardt a jeho kolektiv. Zahrnoval využití tří peptidů typických pro tuto skupinu, a to penetratinu, Tat peptidu a nonargininu. Tyto peptidy byly uměle nasyntetizovány jako fluorescenčně značené analogy. Ke kvantitativnímu pozorování vychytávání živou buňkou (v minulých výzkumech byla buněčná kultura před zobrazením fluorescenčním mikroskopem fixována) byla použita průtoková cytometrie. Experiment byl proveden na HeLa buňkách (z buněčné linie karcinomu děložního čípku pacientky Henrietty Lacksové), jelikož byly nejčastěji používanou buněčnou kulturou v předchozích pokusech na totožných peptidech (Console a kol., 2003; Fittipaldi a kol., 2003; Potocky a kol., 2003; Richard a kol., 2003; Vendeville a kol., 2004). K oddělení přichycených peptidů k buněčné membráně byla před průtokovou cytometrií použita trypsinace buněk (Vendeville a kol., 2004). K pozorování jejich rozložení v živých buňkách byl využit laserový skenovací konfokální mikroskop.

Cílem práce bylo standardizovat podmínky pro všechny tři kationické PPM a sledovat jejich internalizaci za různých koncentrací. V předešlých pokusech mohlo docházet k mylným závěrům, jelikož pro zjištění způsobu transportu samotných PPM byly použity nízké koncentrace peptidů, zatímco pro sledování jejich činnosti uvnitř buněk byly použity PPM již s navázaným nákladem, a to ve vysoké koncentraci (Arnt a kol., 2002; Borsello a kol., 2003; Torgerson a kol., 1998). Tento experiment pokrýval rozsah koncentrace peptidů od 2 μM po 50 μM , které bylo použito v minulých experimentech za účelem lépe definovat jejich způsob vychytávání buňkou.

Bylo objeveno několik zásadních zjištění. Množství penetratinu (pANT) v buňce přímo korelovalo s koncentrací v mediu. Distribuce v buňce byla homogenní při jakékoliv koncentraci. Fluorescenční signál byl převážně lokalizován ve vesikulech. Na rozdíl od pANT peptidu, pro nonarginin a Tat peptid nebyl pozorován lineární nárůst internalizace do buňky se zvyšující se koncentrací. Průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie jasně ukázaly, že při koncentracích vyšších než 10 μM , byl silně zvýšen příjem Tat peptidu a nonargininu. Se zvyšující se koncentrací PPM v mediu bylo možné pozorovat fluorescenční signál nonargininu a Tat peptidu v oblasti jádra a cytoplasmy, nízký signál fluorescence byl pozorován ve vesikulech, jak bylo bylo očekáváno (Tünnemann a kol., 2006).

Výsledkem bylo, že za odlišných koncentrací Tat peptidu a pANT se jejich způsob penetrace do buňky lišil. Makropinocytóza figurovala v transportu polyargininů a Tat peptidu (Kaplan a kol., 2005; Komin a kol., 2017; Wadia a kol., 2004), zatímco pro penetratin je předpokládán pasivní transport, jelikož u něj nebylo pozorováno přestavování aktinové sítě, za účelem tvorby endozomu (Nakase a kol., 2004). Průnik Tat peptidu a peptidů obsahující vysoký podíl argininu (Arg)₉ je silně inhibován nízkou teplotou a nedostatkem ATP, to lze chápat jako potvrzení endocytózy jako způsob vniku do buňky u těchto peptidů (Richard a kol., 2003).

Na základě těchto zjištění bylo stanoveno tvrzení, že použitím fluoroforem značených PPM (nonargininu, Tat peptidu a pANT peptidu) a inhibitorů endocytózy, jsou tyto peptidy schopny v závislosti na své koncentraci penetrovat buněčnou membránou různými podtypy endocytózy (makropinocytosou, klatrinem zprostředkovanou endocytózou a endocytózou závislá na přítomnosti kaveolinu) a dokonce i pasivním transportem (Duchardt a kol., 2007).

Peptidy odvozené od Tat proteinu a polyargininové PPM nevykazují změny struktury, které by pomáhaly ve vazbě lipidické membrány jako je tomu vidno na obr. č. 5 u amfipatických PPM (Ziegler a kol., 2003), dokud nejsou použity delší homopolymery (Carrier a Pérolet, 1986). Rozdíl od amfipatických PPM může být pozorován i při umístění v membráně během internalizace, amfipatické proteiny se zanořují k hlavičkové části lipidů v membráně, zatímco tyto kationické PPM jsou pouze povrchově adsorbovány (Gonçalves a kol., 2005; Tiriveedhi a Butko, 2007; Ziegler a kol., 2003).

Při internalizaci kationických PPM je vyžadována aplikace poměrně vysokých koncentrací (Afonin a kol., 2006) a zároveň vysoký obsah aniontových lipidů (70%) v plazmatické membráně, jež má být destabilizována (Hitz a kol., 2006). V porovnání s amfipatickými PPM jsou kationické peptidy povrchově pohlcovány, což může vysvětlit nutnost aplikovat jejich vyšší koncentraci potřebnou k destabilizaci, jež vytváří na membráně elektroporaci podobný efekt. Připojení nákladu peptidové povahy k fluorescenčně značeným kationickým PPM se projevuje velmi nízkou mírou fluorescence uvnitř buněk, tedy má negativní vliv na účinnost internalizace použitých polyargininů (Maiolo a kol., 2005).

Internalizace amfipatických PPM

Internalizace primárně amfipatických PPM

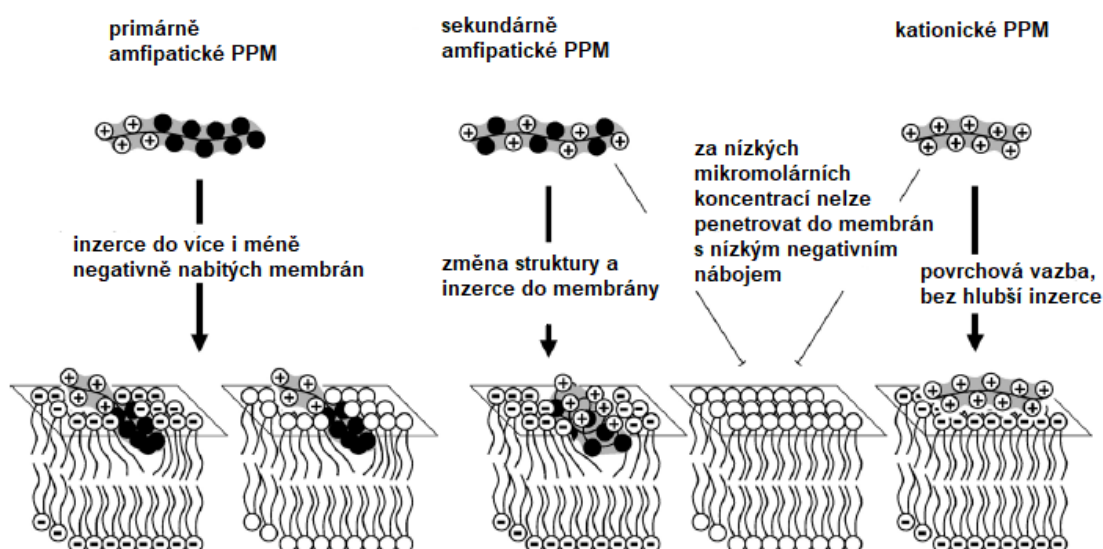
Jejich primární struktura se zakládá na složení z hydrofobních a kladně nabitých AK. Délka jejich sekvence přesahující 20 AK jim umožňuje překlenout hydrofobní jádro membránové dvojvrstvy (Lis a kol., 1982; White a Wimley, 1994). Interakce s buněčnou membránou jsou zahájeny hydrofobními vazbami, tedy spojováním nepolárních částí ve vodném prostředí, čímž omezí styčnou plochu s tímto polárním rozpouštědlem (Magzoub a kol., 2001).

Tyto PPM nevykazují velké rozdíly v afinitě pro záporně nabitě a neutrálním buněčné membrány (Deshayes a kol., 2004a; Maget-Dana, 1999; Magzoub a kol., 2001; Mau a kol., 1999). Z toho lze usuzovat, že hlavní roli hrají hydrofobní interakce, minoritní vliv mají elektrostatické interakce. Poměrně vysoká afinita primárně amfipatických PPM k neutrálně nabitým membránám naznačuje, že se váží v nízkomikromolárních koncentracích k membránám typickým pro eukaryotické buňky (Ziegler, 2008). Obecně penetrují hlouběji, než bylo pozorováno u sekundárně amfipatických PPM, avšak struktura helixu se při tomto způsobu transportu nevyskytuje (Deshayes a kol., 2004a). Jejich způsob internalizace je nejspíše založen na vzájemné asociaci PPM s hlavičkami fosfolipidů v membráně, jak je znázorněno na obr. č. 5 (Mau a kol., 1999; Plénat a kol., 2004; Vié a kol., 2000). To se jeví jako vysvětlení pro teorie podporující přímou translokaci jako způsob průniku těchto těchto PPM.

Zajímavým objevem bylo zjištění, že k rozpouštění (proděravění) membrány dochází u zástupců této třídy (transportan, TP10, MPG) již za submikromolární koncentrace, v porovnání s kationickým antimikrobiálním peptidem mellitinem (Bárány-Wallje Elsa a kol., 2007). V důsledku toho jsou schopné přímo translokovat do buňky i za velmi nízkých koncentrací, ovšem bez přítomnosti objemnějších nákladů (Deshayes a kol., 2004; Deshayes Sébastien a kol., 2006; Henriques a kol., 2005).

Význam složení membrány potvrdil výzkum prokazující, že TP10 se *in vivo* jeví lytickým pro bakterie (*Staphylococcus aureus*), ale ne pro eukaryotické buňky (Nekhotiaeva a kol., 2003). TP10 za koncentrace 6 μM inhiboval růst bakterií, ale na použité HeLa buňky neměl žádný vliv. Za shodné koncentrace TP10 (15 μM) pro bakteriální i savčí buňky prostupoval bakteriální membránou a následně zapříčinil její lýzu, na rozdíl od HeLa buněk, u kterých byla indukována lýza až při vyšších koncentracích použitého peptidu. Z tohoto zjištění lze odvodit důležitou roli složení buněčných membrán pro cílené použití paPPM (Dathe a kol., 2002; Nekhotiaeva a kol., 2003).

Zvláštní postavení v této skupině má peptid Pep-1. Vyniká schopností přímo prostupovat membránami bez jejich rozpouštění (Henriques a Castanho, 2004; Sharonov a Hochstrasser, 2007). V souvislosti s tímto zjištěním je možné vysvětlit toxicitu transportanu, MPG a TP 10 pro buňky i za nízkých mikromolárních koncentrací (Deshayes a kol., 2006; Jones a kol., 2005), zatímco Pep-1 tuto vlastnost nevykazuje (Henriques a Castanho, 2004; Morris a kol., 2001). Je to způsobeno třemi nabitými AK v jeho hydrofobní doméně, které ovlivňují jeho chování natolik, že vstupuje do buňky spíše způsobem bližším saPPM (Deshayes a kol., 2005). To je prokázáno tak, že nepenetruje dostatečně hluboko, jak je charakteristické pro ostatní primárně amfipatické PPM, proto jeví větší podobnost se sekundárně amfipatickými peptidy (Terrone a kol., 2003).



Obr. č. 5.: Znázornění internalizace amfipatických PPM vazbou na hlavovou část fosfolipidů plazmatické membrány. Positivně nabitě (+) a hydrofobní (●) AK jsou součástí PPM, záporně nabitě (-) a neutrální (○) hlavičky fosfolipidů náleží membráně. PaPPM penetrují do membrán s vysokým či nižším obsahem záporně nabitých fosfolipidů a vyvolávají narušení membrány již za nízkých mikromolárních koncentrací. Na rozdíl od saPPM, které při nízkých mikromolárních koncentracích vyžadují vyšší obsah záporně nabitých fosfolipidů, jež už není typické pro eukaryotické buněčné membrány. Jako poslední je znázorněna pouze povrchová inzerce kationických PPM. (převzato a upraveno z Ziegler, 2008)

Internalizace sekundárně amfipatické PPM

Délka sekvence a její konformace hrají neméně stejně důležitou roli jakou je kumulace pozitivního náboje PPM (Mueller a kol., 2008). O důležitosti 3D struktury jsme se přesvědčili už při zmínění transportanu (α helix) (Lindberg a kol., 2001) a penetratinu (β list) (Magzoub a kol., 2003). Tyto struktury totiž pomáhají v internalizaci navozením dezorganizace v buněčné membráně (shrnutí v Guidotti a kol., 2017).

Na rozdíl od primárně amfipatických peptidů vykazují tyto PPM mnohem větší afinitu k membránám s vysokým obsahem negativně nabitých lipidů, a zároveň zanedbatelnou afinitu k neutrálním membránám (Ghibaudi a kol., 2005; Magzoub a kol., 2001). Nicméně jejich vazba není podmíněna pouze nábojem membrány. Při interakci s membránou zaujímají specifické sekundární struktury α helixu (Dathe a kol., 1996) nebo β listu (Blazyk a kol., 2001; Oehlke a kol., 1997), na kterých jsou separátně rozdělené nabitě a nenabitě AK. Tvorba helixu a β listu je totiž energeticky výhodná při zabudovávání PPM do membrány (Wieprecht a kol., 2002).

V porovnání s primárně amfipatickými PPM nedochází k žádnému děravění membrány, ani za fyziologické koncentrace peptidu (pod $100 \mu\text{M}$), pokud je buněčné membráně nízký obsah záporně nabitých složek (pod 50 %) (Binder a Lindblom, 2003). K vazbě obecně dochází třemi možnými

způsoby: pomocí elektrostatických interakcí, hydrofobních vazeb a změn sekundární struktury na α helix, případně β list. K posouzení afinit amfipatických PPM k membránám byla věnována termodynamická studie, vyjadřující schopnost paPPM i saPPM přejít z vodné fáze do lipidové. Poskytla tak odhad, jaký přínos představují elektrostatické a hydrofobní interakce pro vazbu PPM na membránu. (Ziegler, 2008).

Orientace lipidových polárních hlaviček se mění během vazby saPPM. To slouží jako indikátor jejich internalizace do membrány (Kichler a kol., 2006; Mason a kol., 2005; Roux a kol., 1989). Pokud ovšem chceme pozorovat interakce za nízkých mikromolárních koncentrací je nezbytná přítomnost velkého počtu záporně nabitých lipidů.

Možnosti úniku PPM z endozomů a konkrétní příklady

Většina známých PPM využívá k dopravě do buňky právě endocytózu. Častou komplikací bohužel bývá uvěznění peptidu i s nákladem v endozomálním váčku, jehož obsah směřuje k degradaci nízkým pH a hydrolytickými enzymy lysozomů. To je kritický bod pro použití PPM v klinické praxi za účelem efektivní dopravy látek do buněk. Pokud není PPM i s nákladem vyproštěn z endozomu, nemohou tak potencionální terapeutika působit přímo v cytoplasmě či se dopravit do jádra, tedy do místa jejich teoretického působíště. Z těchto důvodů je tedy často nutné podpořit PPM v překonání endozomální membrány různými modifikacemi.

Zabudování pH citlivých domén

Jednou z perspektivních metod, jež by mohly usnadnit vyproštění PPM i s nákladem z endozomu je zabudování pH citlivých domén do sekvence PPM našeho zájmu. Princip takových domén je takový, že při změně endozomálního pH dochází ke změnám v konformaci peptidu, čímž zahájí narušení membrán. Příkladem může být amfipatický, na histidin bohatý PPM, vykazující α helikální strukturu, LAH4. Tento peptid vyniká vlastností zainkorporovat se do endozomální membrány při neutrálním pH a při jeho snížení způsobit protonaci histidinových AK, které způsobí destabilizaci membrány (Kichler a kol., 2003; Mason a kol., 2005). Tento amfipatický peptid zaujímá α helikální strukturu při vazbě na plazmatickou membránu, kde se váže preferenčně na proteoglykany (HS) a následně prostupuje membránou. V endozomu se ještě za pH 7,5 zanořuje lysinovými zbytky do membrány a chová se tak, jako hydrofilní transmembránová kotva. Za snížení pH dochází k přeměně struktury peptidu na planární souběžně s protonací jeho čtyř histidinových AK, výsledkem je narušení membrány (Kichler a kol., 2006).

Toto bylo s efektivním výsledkem vyzkoušeno konkrétně u histidinových a cysteinových domén. Vhodným adeptem ke zkoumání vlivu těchto pH citlivých domén je například Tat peptid, jelikož sám neobsahuje kyselé AK, jež by se mohly protonovat a v důsledku toho není schopen zaujmout α helikální strukturu, která pomáhá mnoha peptidům v penetraci (Crombez a kol., 2008).

Jako náklad byla v popisovaném experimentu využita plasmidová DNA (pDNA), kterou je schopen Tat peptid vázat zřejmě na základě elektrostatických interakcí. Jako detekční agens byl zainkorporován gen kódující luciferázu pro rozpoznání dopravy této pDNA do jádra (Rudolph a kol., 2003). Genová exprese tohoto genu byla sledována. Při zabudování sekvence deseti histidinů k C-konci Tat peptidu, byla následně pozorována dvakrát až třikrát vyšší exprese genu, různé odchylky byly způsobeny z důvodu nestability vazby histidinové části k Tat-DNA konjugátu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití tohoto homopolymeru histidinu kovalentně připojeného k C-konci Tat peptidu. Tat-10H dosahoval až 7 000krát lepších výsledků, v porovnání s Tat peptidem bez histidinu nebo bez navázání chemickou konjugací. K potvrzení tohoto úspěchu byl zaveden bafilomycin A1, inhibitor H^+ -ATPázové pumpy. Tato část je hnací silou okyselování vnitřního prostředí endozomu. Inhibicí této protonové pumpy dojde k zastavení okyselování vnitřku endozomu. V důsledku toho nebude histidin v pH citlivých doménách protonován a PPM nezmění svoji konformaci. Nemůže tedy dojít k narušení membrány a celý komplex zůstane uvězněn v endozomu. Při aplikaci bafilomycinu byl viditelný rapidní pokles uniklého Tat-10H. Tímto bylo dokázáno, že přítomnost imidazolových skupin na histidinu je klíčová pro úspěšný únik plasmidové DNA z endozomu a její následnou expresi.

V případě vložení cysteinové části byly zainkorporovány disulfidové můstky k zajištění vyšší stabilizace komplexu cystein-Tat-DNA. Nejlepší kombinací se stal komplex C-5H-Tat-5H-C, obsahující 2 cysteiny a 10 histidinů rovnoměrně připojených k oběma koncům sekvence Tat, tento komplex poskytoval až 1000krát lepší výsledky v genové expresi.

Bohužel vysoký N/P podíl, tedy podíl molů aminoskupin na skupiny fosfátů obsažené v DNA, jež byla součástí dopravovaného komplexu, naznačuje nesnadné použití. Tento podíl má význam v komplexu nukleové kyseliny a jeho zbytku, jelikož ovlivňuje celkový náboj, velikost, a nakonec i jeho stabilitu. Zvýšení tohoto podílu má kladný vliv na zvýšenou expresi genu *in vitro* v závislosti na jeho vysokém kladném náboji. Ten umožňuje vyšší prostupnost membránami a tím i vyšší genovou expresi. To je vykoupeno cytotoxicitou, kterou způsobuje pohyb přebytku volného kladně nabitého polymeru (Gary a kol., 2013; Zhao a kol., 2009). To tedy naznačuje, že by mohlo dojít k vyvolání silné imunitní reakce, tento nastalý problém by mohla vyřešit nižší koncentrace peptidu (Lo a Wang, 2008).

Maskování pH citlivou doménou v cílení na nádorové buňky

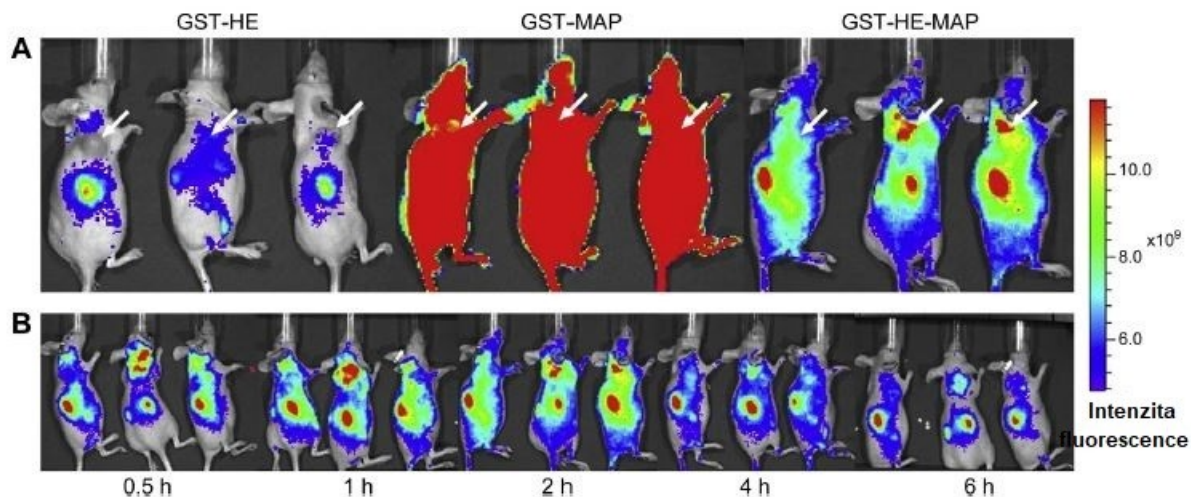
Důležitost pH a pH senzitivních domén, jež lze použít k usnadněnému úniku z endozomu, je popsáno i v další studii, která zároveň řeší i otázku cílení peptidů na konkrétní tkáň. Zainkorporováním pH senzitivní domény, jež po změně pH změní svoji konformaci a naruší tak membránu, lze totiž cílit i na místa, která se vymezují nižším pH jako je zánětlivé ložisko, nádorové mikroprostředí nebo endozom. Při cílení na nádory je však obtížné modelovat částici tak, aby

rozeznala nádorové extracelulární prostředí, jež je pouze o 0,4 až 0,8 jednotek pH nižší než pH okolní tkáňe, využití pH citlivé domény k detekci těchto míst je efektivní alternativou (Gerweck a Seetharaman, 1996).

Touto pH senzitivní doménou byla sekvence histidin-glutamátu (HE), která byla připojena přes pentaglycinový linker k modelovému amfipatickému peptidu (MAP). MAP peptid byl vybrán z důvodu obstojných výsledků při dopravě částice do cytosolu i do jádra endocytickou cestou, zvláště díky jeho struktuře (Kenien a kol., 2012). K vytvoření komplexu již zbývalo pouze připojení nákladu, v tomto případě glutathion-S-transferasy (GST). Použití tohoto komplexu se porovnávalo se syntetizovanými analogy, jež měly zabudovanou pouze HE nebo MAP část (HE-GST a MAP-GST komplexy). Pro experiment byl využit xenografní myší model lidského karcinomu prsu, v tomto modelovém organismu bylo povoleno nechat narůst nádory do velikosti 0,5-1 cm³. Byla pozorována vysoká míra internalizace do těchto nádorových buněk a zároveň ne do jiných. To bylo dosaženo tak, že negativně nabitý glutamát v HE sekvenci maskoval pozitivní náboj lysinu obsaženému v MAP peptidu a tím zamezil nespecifické vazbě na záporně nabitě komponenty buněčné membrány (Zaro a kol., 2012). Při změně pH došlo k protonaci histidinu, což narušilo vazbu HE k MAP a ten využil svých silných vlastností ve vazbě na buněčný povrch.

Zkoumané peptidy byly pro *in vitro* pokus označeny radioaktivním jodem. Při inkubaci s HeLa buňkami za neutrálního pH (7,5-7) vykazoval komplex I-GST-HE-MAP zanedbatelnou vazbu na buňku, ovšem jen do té doby než se pH (6,5-6) snížilo, poté byl pozorován tří až šestnásobný nárůst.

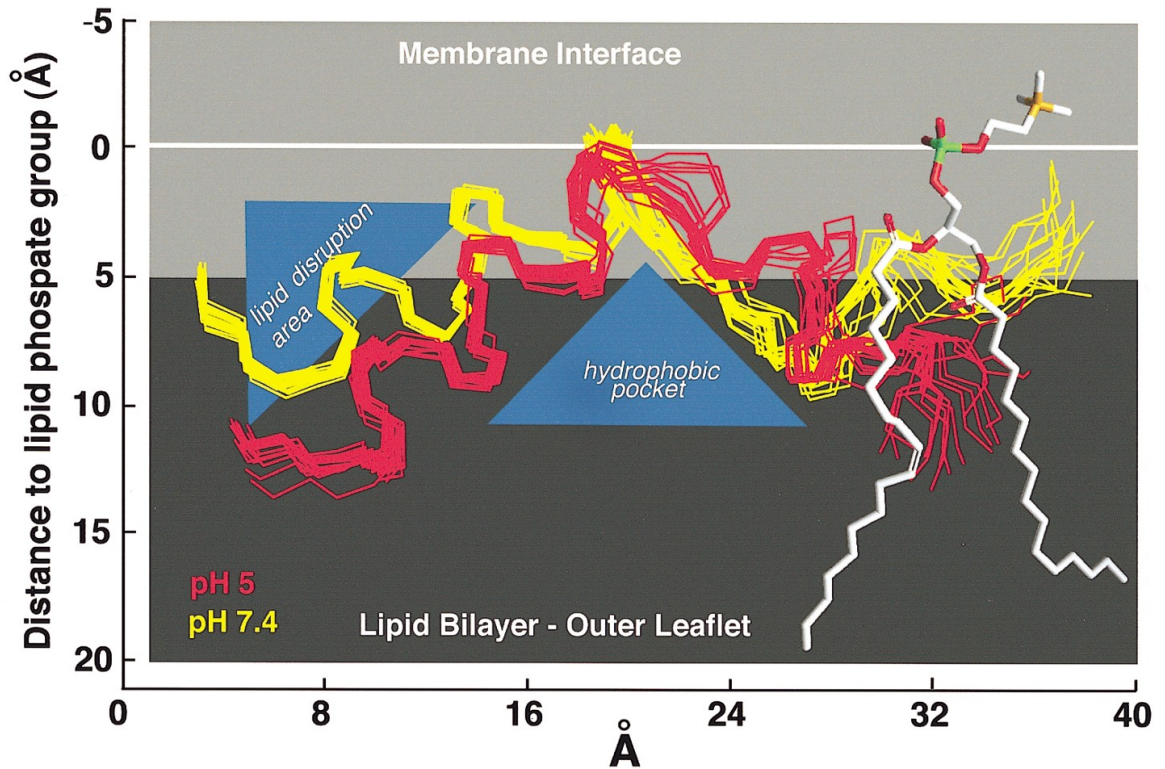
Aby se tyto slibné vlastnosti potvrdily i v prostředí *in vivo* všechny komplexy byly obarveny červenou fluorescenční barvou IR800. Zkoumané komplexy byly posléze nitrožilně vneseny do myšího modelu s nepatrně nižším pH okolo tumorů (Gillies a kol., 2002). Poté byla pozorována silná fluorescence okolo nádorů, jež trvala i 24 hod po aplikaci. Časový průběh rozprostření barvených komplexů je znázorněn na obrázku č. 6. Barvivo se rozprostřelo po hodině od aplikace, zbytkové se vyloučilo po necelých 6 hodinách od aplikace. Nejvyšší detekovatelný fluorescenční signál IR800-GST-HE-MAP byl pozorován v nádoru a v ledvinách. IR800-GST-HE-MAP byl nalezen v minimálním množství v játrech a ve slezině, nedetekovatelný byl ve slinivce a srdci. V porovnání se zbylými dvěma komplexy, IR800-HE-GST vykazoval všeobecně slabý signál, o poznání větší fluorescence byla pozorována u IR800-MAP-GST, jež byl také nashromážděn u nádorů. Ostatní známky fluorescence v oblasti jater a ledvin byly pouze z důvodů zbavování se těla od tohoto proteinu. Další velkou výhodou zainkorporování HE sekvence byla i jeho role ve snížení cytotoxicity. Při použití MAP peptidu samotného vykazoval za větší koncentrace než 2 μM cytotoxicitu, v tomto případě za obdobné koncentrace nikoli (Scheller a kol., 1999). IR800-GST-HE-MAP byl pozorován v oblasti nádoru již po půl hodině a s největší intenzitou mezi první a druhou hodinou od aplikace. (Fei a kol., 2014).



Obr. č. 6.: (A) Zobrazení tří fluorescenčně značených komplexů IR800-HE-GST, IR800-MAP-GST, IR800-GST-HE-MAP *in vivo* v koncentraci 3,65 nmolů po nitrožilní injekci. Bílá šipka označuje tumor. V pravé části je škála intenzity fluorescence. (B) Časový průběh rozptřeni fluorescenčně barveného komplexu IR800-GST-HE-MAP *in vivo* po dobu 6 hodin od nitrožilní injekce (převzato a upraveno z Fei a kol., 2014)

Zavedení fúzogených peptidů

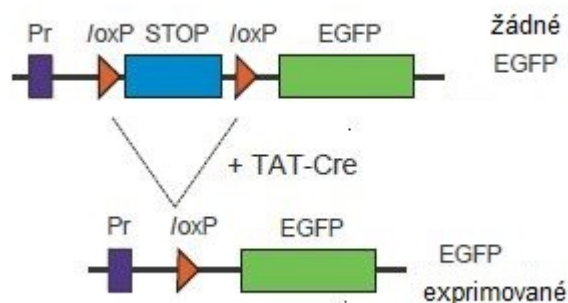
Fúzogenní peptidy se vyskytují u obalených virů a jsou některými z nich využívány jako úniková strategie při uvolňování virové částice z endozomu s cílem pomnožit se v hostitelské buňce (Skehel a kol., 2001). Například peptid HA2, jenž byl separován z obalového glykoproteinu hemagglutininu, je původně zodpovědný za velmi pružnou variabilitu virového obalu chřipky typu A, jenž mu umožňuje unikat před imunitním systémem a zároveň je nezbytný k navázání na hostitelskou buňku (rozeznává kyselinu sialovou přítomnou v glykoproteinech na povrchu buněk). Konkrétně 20 aminokyselin nacházejících se na N konci peptidu má důležitou roli. Za sníženého pH (5) se jejich α helikální struktura ostřeji zalomí (způsobeno rotací Glu15 a Asp19) a vytvoří hlubší hydrofobní kapsu, jež se zanořuje hlouběji do lipidové dvojvrstvy, viz obr. č. 7. Tímto způsobem dochází k destabilizaci membrány (Han a kol., 2001).



Obr. č. 7.: Změny v konformaci fúzní domény HA2 peptidu v lipidové dvojvrstvě za sníženého pH (znázorněno červeně) a za fyziologického pH (znázorněno žlutě). Bílý objekt představuje fosfolipid prostupující membránou. Tmavě šedá zóna je specifikována pro hydrofobní uhlovodíkové řetězce a světlejší šedá pro polární část lipidové dvojvrstvy. Kritické oblasti poukazující na lipid-proteinové interakce jsou označeny modrým trojúhelníkem (převzato z Han a kol., 2001).

Schopnost peptidu HA2 destabilizovat membránu byla využita ke zlepšení schopnosti Tat peptidu uniknout z endosomu. K detekci úspěšného uvolnění z endozomu byla použita Cre rekombináza, což je enzym zodpovědný za místně specifickou rekombinaci. Po úspěšném transportu do jádra v takzvaných loxP místech na DNA vyštěpí původní sekvenci a nahradí ji detekčním genem. Záměrem bylo ji použít k vystřížení původní sekvence (STOP segment DNA) mezi loxP místy a posléze ho nahradit genem kódujícím zesílený zelený fluorescenční protein (EGFP), viz obr. č. 8. Z důvodu vyhnout se obtížím způsobených fixací byl experiment proveden na živých myších T buňkách nesoucích gen pro EGFP a před ním STOP sekvenci ohraničenou loxP místy. Při použití tohoto Tat-HA2 komplexu dopraveného do váčků makropinosomů, zároveň za zvyšující se koncentrace Tat-Cre komplexu v témže váčku, bylo ze 70 % dosaženo rekombinace, tedy pozorované fluorescence po místně specifické rekombinaci. V porovnání s použitím kontrolního Tat-Cre konjugátu, který dosahoval rekombinace pouze ze 30 %, tak jako samotný HA2 peptid, kontrolní Tat dosáhl míry rekombinace ze 40 %. Je důležité zmínit, že nebyla zjištěna cytotoxicita, ani působení na

jiné membrány v buňce. Právě cytotoxicita totiž limituje klinické použití endozomálních disruptorů, jako je chloroquin a polyethylenimin, při jejich efektivní koncentraci (Wadia a kol., 2004).



Obr. č. 8.: Způsob detekce dopravy Tat peptidu založený na místně specifické rekombinaci s využitím Cre rekombinázy. Vystřížení transkripčního STOP segmentu DNA (obarven modře) konjugátem Tat-Cre (Tat peptid s Cre rekombinázou) mezi vyznačenými loxP místy (znázorněna oranžově) zapříčiní expresi EGFP genu (znázorněn zeleně), Pr – promotor (označen fialově) (převzato a upraveno z Wadia a kol., 2004).

Akumulace pozitivního náboje

Dalším východiskem z této situace se jeví možnost akumulovat na jedno určité místo lipidové membrány vysokou hustotu pozitivního náboje a tím membránu destabilizovat. Tato vize byla nejprve aplikována na protein GFP (green fluorescent protein), tento protein fluoreskuje zeleným světlem pokud je ozářen světlem modrým, při nejvyšší excitaci dochází při ozáření světlem délky 395 nm. Již dříve bylo známo, že pováření a zchlazení nebrání tomuto peptidu zářit ani vázat reverzibilně DNA a RNA. Tomuto GFP byly záporně nabitě AK vyměněny za pozitivně nabitě, za předpokladu, že by mohl vázat také negativně nabitě komponenty savčích buněčných membrán. Tím tento protein získal neobyčejně vysoký pozitivní náboj, proto označení supernabitě proteiny, a byl úspěšně využit k dopravě siRNA a pDNA (Lawrence a kol., 2007; McNaughton a kol., 2009).

Princip akumulace pozitivního náboje za účelem destabilizovat membrány inspiroval k vytvoření nových PPM jako je 3TAT, 2TAT, 1TAT. Pojmenování koreluje s počtem kopií peptidu Tat, jež byly připojeny na syntetickou kostru (KGKKGK) C-koncem. N-konec této kostry byl označen karboxy-tetrahodaminem, červeným fluoroforem, za účelem detekovat a kvantifikovat tento komplex v buňce. 2TAT peptid při použité koncentraci 4,5 μM dosáhl pouze 10% úspěšnosti při detekci fluorescence v jádře a v cytoplasmě. Zato peptid 3TAT dosáhl fluorescence v těchto oblastech u 50 % buněčné populace. Při aplikaci vyšší koncentrace peptidu než 3 μM však začal peptid vykazovat známky toxicity, při koncentraci 5 μM už byl zřetelně toxický, proto nebyl za vyšší koncentrace použit. Bylo prokázáno, že nejvyšší použité koncentrace, 9 μM pro 1TAT s 4,5 μM pro 2TAT, nikdy

nedosáhnou výsledků obdržených 3TAT peptidem při 3 μM koncentraci. Jinými slovy aplikace vyššího počtu kopií Tat peptidu v rámci jednoho komplexu je efektivnější než aplikace samostatných Tat peptidů navzdory vyšší koncentraci. Paradoxem je, že byla pozorována nižší internalizace 3TAT peptidu (1 μM) do buňky, než tomu bylo u 2TAT (4,5 μM), zároveň 3TAT vykazoval vyšší fluorescenci v cytoplasmě jako výsledek úspěšného úniku z endozomu.

Jako náklad byla použita Cre rekombináza produkující v Cre-LoxP rekombinačním systému (po místně specifické rekombinaci) GFP protein. Dalším použitým nákladem byl malý membránu neprostupující protein SNAP-Surface 488 způsobující fúzi histonů, která se projeví fluorescencí jádra. V dopravě SNAP do jádra byl mnohem úspěšnější 3TAT konjugát (53,4 % fluoreskujících buněk), výsledky 1TAT (1,6%) i 2TAT (6,6%) byly o poznání nižší. Princip vyproštění z váčku je takový, že Tat peptid interaguje s BMP (bis(monoacylglycerol)fosfát, z anglického bis(monoacylglycero)phosphate), tedy s negativně nabitými lipidy v membránách pozdních endozomů. BMP tak zprostředkovává přesun Tat peptidu hlouběji do hydrofóbního vnitřku membrány a indukuje fúzi membrán (Erazo-Oliveras a kol., 2016).

Již dříve bylo prokázáno, že přítomnost monoklonálních protilátek (anti-BMP) zamezující fúzi membrán pozdních endozomů blokuje únik Tat peptidu z váčku (Erazo-Oliveras a kol., 2016). Byl ověřován vliv této protilátky na váčky s 3TAT, ty posléze vykazovaly bodové rozložení fluorescence i nižší míru úniku do cytosolu, což značí, že 3TAT peptid zůstal uvězněn v endozomu i s dopravovaným nákladem. Ani v tomto případě nesmí být opomenuta cytotoxicita 3TAT peptidu, jež je přítěžující okolností pro klinické použití, jelikož soustředěný kladný náboj může způsobit nekontrolovatelné narušení jiných než cílových membrán. Zajímavá se zdá být informace, že ačkoliv 2TAT peptid i dTAT (dimerní fluorescenční Tat peptid) oba obsahovaly dvě kopie Tat peptidu, 2TAT si vedl hůře v internalizaci do buňky. Na zhoršenou internalizaci může mít vliv počet navázaných fluoroforů, jelikož nefluorescenční značené Tat peptidy vykazovaly nižší míru internalizace než fluorescenčně značené. Příčinou může být také délka linkeru mezi Tat peptidy. (Brock a kol., 2018)

Vliv značení fluorofory

Jak bylo nastíněno výše, vliv fluoroforů používaných k detekci pohybu PPM v buňce může ovlivňovat samotné chování těchto peptidů. Již z chemického hlediska by se dalo odvodit, že připojením objemné, rigidní a hydrofobní části k často hydrofilním, krátkým peptidům se chování celého komplexu změní (Hirose a kol., 2012). Navzdory častému používání fluoroforů k značení PPM není dostatečně známo, jak ovlivňují interakci takto značených PPM s membránami.

Touto problematikou se zabývala studie používající pANT (penetratin) jako PPM s rozličnými navázanými fluorofory ke sledování interakcí se savčími buněčnými kulturami. Výsledky poukazují na vyšší cytotoxicitu takto značené PPM (Birch a kol., 2017). Ve zmíněné studii bylo zjištěno, že navazování N-koncově připojených fluoroforů nemá negativní dopad na zaujímání sekundární

struktury penetratinu (v tomto případě α helixu), tudíž nebrání efektivnímu navázání PPM na membránu. Dokonce konjugáty pANT_{MCA} (komplex 7-methoxycoumarin-4-yl kyseliny octové-pANT) a pANT_{PBA} (1-pyren máselná kyselina-pANT) vykazují značně vyšší míru zaujímání této struktury při vazbě na membránu, než tomu bylo u jiných použitých konjugátů. Jako model pro zkoumání internalizace PPM bylo využito lipidové dvojvrstvy na pevném podkladu (SLBs z anglického supported lipid bilayers) (Richter a kol., 2006). Internalizace konjugátů do membrány byla analyzována uvolňováním fluorescenčně značeného vápníku z váčků, na něž působily PPM, a dynamického rozptylu světla. Bohužel samotný penetratin se váže pouze v hlavové části fosfolipidů a významněji nezasahuje do hydrofobního vnitřku membrány (Berlose a kol., 1996). Důkazem budiž jeho nízké, řádově molární hodnoty koncentrace při uvolňování vápníku, zatímco konjugáty pANT_{RhB} (konjugát rhodaminu B s penetratinem) a pANT_{PBA} (konjugát kyseliny 1-pyren máselné s penetratinem) vykazovaly výrazně vyšší únik vápníku a to za použití nízké molární koncentrace samotného penetratinu.

Získané výsledky poukazují, že tyto konjugáty prostoupily membránou micelací SLBs. Úspěšná internalizace konjugátů pANT_{RhB}, pANT_{PBA} byla patrně zapříčiněna jejich vysokým stupněm hydrofobicity v porovnání s ostatními. U těchto konjugátů byly pozorovány také nejvyšší hodnoty v propustnosti a narušení membrány, jakožto i v hloubce jejich zakomponování se do lipidové dvojvrstvy. Zajímavou se jeví skutečnost, že navzdory podobným účinkům se připojené fluorofory strukturou navzájem liší (Hedegaard a kol., 2018). Vlivu fluoroforů by se tedy jistě dal využít ku prospěchu při použití specifických PPM, avšak k detekci obecně by bylo vhodnější použít například radioaktivního značení a zamezit tak ovivnění přirozeného chování peptidů při jejich pozorování.

Využití fotochemické indukce

Jako další možnost k navození ruptury endozomu bylo využití fotochemické indukce. Tato zajímavá metoda je založena na stejném principu jako fotodynamická terapie, která je celosvětově využívána k léčbě k různým nádorů. Je zajištěna přítomností na světlo citlivého, v nádoru se hromadícího fotosenzibilizátoru (FS), který po ozáření převede svoji energii na molekulární kyslík, jenž tvoří reaktivní formy kyslíku (z anglického ROS-reactive oxygen species), nejčastěji zastoupeny singletovým kyslíkem, jenž se podílí zejména na denuraci membrány peroxidací lipidů v okolí tohoto fotosenzibilizátoru (Felsher, 2003). Naruší tím membránu a ničí tak rakovinotvorné buňky.

Fotosenzibilizátor je zpravidla amfifilní látka, která se zainkorporuje do plazmatické membrány, potažmo do membrány endozomu. V lumen endozomu se nachází i hydrofilní látka (terapeutikum), která je distancována od FS v membráně, jelikož by ji mohl degradovat. Po kontrolovaném a lokálním osvětlení dojde k ruptuře membrány výše zmíněným mechanismem a uvolnění FS i terapeutika do cytosolu (Maiolo a kol., 2004; Selbo, 2000; Selbo a kol., 2010).

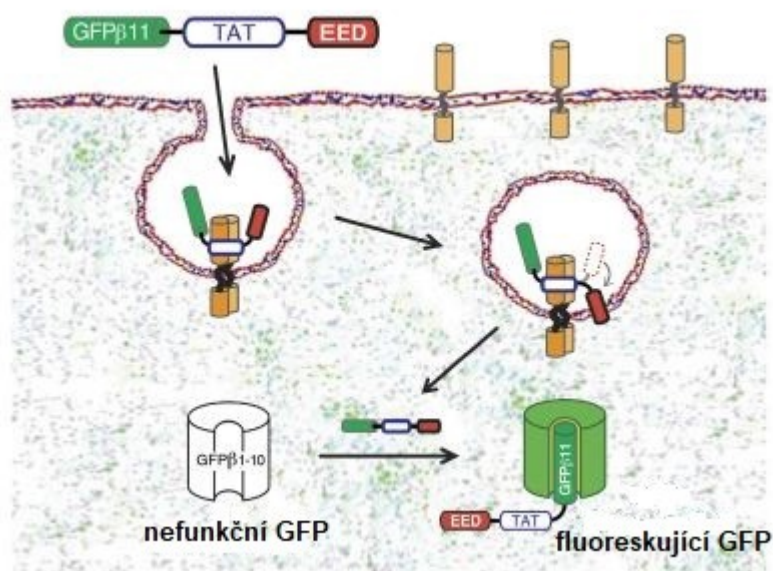
Jako PPM byl použit peptid TP10 biotinylován na N-konci (TP10b) a jako připojený náklad proteinové povahy byl využit tubulin. Tento peptid má výhodu v tom, že po fotoindukčně navozené ruptuře endozomu se zainkorporuje přímo do buněčných mikrotubulů vyskytujících se v cytoskeletu. Komplex TP10 s nákladem byl vizualizován hydrofobními fluorofory Alexa Fluorem 633, Texas Red nebo TRITC, fluorofory plnily zároveň funkci FS. Předpokládá se, že po osvětlení excitované elektrony fluoroforu indukují tu samou peroxidaci lipidů a následnou rupturu jako jiné fotosensibilizátory (Srinivasan a kol., 2011). Tento komplex byl inkubován za různých poměrů s buňkami ovarii divokého čínskému křečka po dobu 1 h. Fotoindukce bylo dosaženo rtuťovou lampou vyzařující vlny o délce 545-580 nm, jejímž cílem bylo ozářit fluorofory připojené ke konjugátu TP10b s nákladem. Po osvětlení byly pod mikroskopem viditelné záblesky v cytosolu, což svědčí o úspěšném úniku z endozomu. Komplex fluoroforu-TP10b a nákladu proteinové povahy projevil schopnost vystoupit z endozomu i s nákladem v 90 % případů buněčné populace bez přídavného fotosensibilizátoru a za krátkého ozáření světlem o vlnové délce 545-580 nm. Fotoindukovaný únik z endozomu nastal pouze za určitých okolností. A to tehdy, když bylo dosaženo dostatečné akumulace PPM a nákladu v endozomu a bylo poskytnuto minimálně 6 hodin k akumulaci komplexu v endozomech. Použitím streptavidinu (SA), avidinu (Av) a neutravidinu (NA) jako jiných dopravovaných molekul proteinové povahy, byl zjištěn vliv náboje nákladu na endozomální únik. Čím více je náklad pozitivně nabitý, tím je pozorován nižší fotoindukovaný únik z endozomů. To lze vysvětlit vyšším anionickým nábojem SA, který může vázat elektrostatickými silami více peptidů než Av.

Podmínkami k efektivnímu uvolnění komplexu do cytosolu je zejména čas potřebný k destabilizaci membrány a určitý poměr peptidu ku nákladu. Ideálním se zdá být čas alespoň 6 hodin a poměr peptidu ku nákladu 8:1. Positivní zjištění je, že při použití délky světla nebo laseru (635 nm) 85-90 % buněk nebylo zničeno. K ověření, že transportovaný náklad je dopraven funkční a nepoškozený byl vybrán právě tubulin, který je svou velikostí a nábojem blízký streptavidinu. K dosažení lepších výsledků byl ke komplexu tubulin-TRITC (fluorofor)-TP10b přidán konjugát SA-Alexa Fluor 633. Byla pozorována úspěšná inkorporace do mikrotubulů ve více než 50 % buněk. Bohužel není znám způsob, jakým je membrána narušena. Vazba streptavidinu na peptid může fungovat také jako ochrana před degradací. Zajímavé bylo také zjištění, že po fotoindukci zůstává děravý endozom relativně neutrální (pH=6) v důsledku deaktivace protonových pump. Tyto pumpy generují kyselé prostředí uvnitř endozomu, avšak vytvořené póry patrně způsobují únik protonů, v důsledku čehož nabývá endozom téměř fyziologických hodnot. (Räägel a kol., 2013). Osud těchto endozomů nebyl dále popsán, ale může být inspirací pro další bádání. Tato metoda již dosáhla II/III fáze klinických testů a slibuje klinické použití při nádorové terapii (Selbo a kol., 2010).

Využití domén schopných uniknout z endozomu

Dalším řešením, jak zefektivnit uvolnění PPM s nákladem z endozomu je zavedení synteticky vyrobených domén schopných uniknout z endozomu (EEDs z anglického endosomal escape domains). Tyto domény jsou krátké sekvence zpravidla hydrofobních aminokyselin, vyznačující se sklonem destabilizovat membrány.

Tyto domény byly následně připojeny k peptidu Tat a peptidu odvozenému od zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). GFP je složen z 11 β listů, které určují proteinu strukturu barelu. Vyjmutím 16 AK z této struktury vznikne velký nefluorescenční fragment (Cabantous a Waldo, 2006; Cabantous a kol., 2005; Kaddoum a kol., 2010). Při inkubaci vyjmuté části (GFP β 11) se zmíněným fragmentem (GFP β 1-10) se opět protein stává funkčním fluoroforem jak je znázorněno na obr. č. 9.



Obr. č. 9.: Použití GFP k detekci úniku Tat peptidu z endozomu. PPM se nejprve váže na negativně nabitě glykoproteiny buněčné membrány a poté je endocytován. Je navozen únik GFP β 11-PPM-EED komplexu z endozomálního váčku inzercí hydrofobní EED domény do lipidové dvojvrstvy. Vazba GFP β 11 s nefluorescenčním fragmentem GFP β 1-10 v cytoplasmě zapříčiní vznik fluorescenčního proteinu GFP (převzato a upraveno z Lönn a kol., 2016).

Tento princip byl využit k detekci v současné studii. GFP β 11 peptid byl připojen k Tat-EED peptidu přes disulfidový linker, který dovoľoval GFP β 11 nákladu oddělit se od zbytku uvnitř buňky. Pozorovaná cytotoxicita způsobená blízkostí EED domény a Tat peptidu komplikovala použití tohoto komplexu, proto byl zaveden úsek polyethylenglykolů (PEG), který tento nechtěný projev odstranil. PEG je totiž inertně se chovající molekula, snižující riziko vyvolání imunitních reakcí a zároveň

předcházející degradaci v savčích buňkách, proto je často využíván k účelům modelovat vlastnosti dopravovaných částic (Abuchowski a kol., 1977; Roberts a kol., 2002; Working a kol., 1997). Zavedení 6 PEG jednotek mezi Tat peptid a EED se ukázalo jako nejvýhodnější počet, sestavený komplex vypadal takto: GFP β 11-(S-S)-TAT-PEG6-GWWG(EED). Přidáním specifických hydrofobních úseků do EED zahrnujících dva aromatické indolové kruhy nebo jeden indolový kruh a dva aromatické fenolové kruhy ve fixované vzdálenosti šesti polyethylenglykolů od Tat/nákladu vykazoval nejsilnější signál fluorescence, dopravu z endozomu do cytoplasmy.

Byl pozorován zvýšený únik komplexu do cytosolu, ale i rapidně snížená cytotoxicita včetně nejvyšší použité koncentrace (60 μ M). EED domény byly syntetizovány z aminokyselin jako je tryptofan (W) a fenylalanin (F), které destabilizují lipidové membrány díky hydrofobním R skupinám (Chen a kol., 2011; Roberts a kol., 2002). Za různých kombinací těchto dvou AK se dospělo k 7 odlišným EED doménám. Nejlepších výsledků bylo dosaženo zvýšením hydrofobicity při zapojení F-W-F nebo dvou W ke zbývajícimu komplexu na jeho C-konec. Takto bylo dosaženo pětikrát lepších výsledků bez příznaků cytotoxicity. To se změnilo při zavedení 6 Trp, poté totiž dramaticky vzrostla cytotoxicita, jež brzdila internalizaci. Vylepšením bylo i zavedení dvou glycinů mezi dva tryptofany. Tato studie tedy prokázala, že zavedení 6 jednotek PEG, tedy osmnácti-uhlíkového linkeru mezi PPM a EED doménu snižuje cytotoxicitu, ale neovlivní efektivitu internalizace do buňky. (Lönn a kol., 2016).

Srovnání vlastností za sjednocených podmínek

Na závěr se nabízí zmínit nedávnou studii, jež se může stát velmi užitečnou pomůckou pro další bádání. V průběhu let byly objevovány další a další PPM, které však byly v experimentech používány za rozličných, a tedy vzájemně nesrovnatelných, podmínek. Z tohoto důvodu se soustředí na srovnání 474 PPM vybraných z databáze (Gautam a kol., 2012), která rovněž poskytuje informace o struktuře a sekvenci již více než 700 popsaných PPM. Byly vybrány takové peptidy, které nejsou delší než 24 AK, nenesou proteinogenní AK zbytky (20 AK tvořících proteiny, na druhém uhlíku mají navázanou aminoskupinu- α forma a zároveň jsou L-izomery), nevykazují cyklickou strukturu ani se neváží na receptor, ani netvoří póry. Tímto postupem bylo vybráno oněch 474 peptidů v délce 4-24 AK. V posledním kroku syntézy byl ke všem 474 peptidům přidán na N-konec fluorofor FAM (fluorescein amidit), který sloužil jako náklad a zároveň jako reportér k lokalizaci peptidu. Peptidy byly inkubovány za totožných podmínek na buněčné linii karcinomu děložního čípku (HeLa), při koncentraci 10 μ M, jež byla hojně používána v experimentech (Mueller a kol., 2008), po dobu 90 minut. Po této době by mělo být možné efektivně pozorovat internalizaci *in vitro*.

Za těchto podmínek byly pozorovány výrazné rozdíly. Některé PPM neprokázaly žádný výsledek v dopravě FAM do buňky, tedy výsledek byl stejný jako by byl použit samotný FAM, zatímco 20 nejlepších vykazovalo až 70krát vyšší účinnost v dopravě FAM do buňky ve srovnání

s FAM samotným (hodnoceno srovnáním míry fluorescence). Ve studii se dále soustředili na sekvenční vlastnosti těchto peptidů, jež se podepisují na jejich schopnosti proniknout membránou. Zásadním bylo zjištění, že peptidy, jež byly delší než 13 AK vykazovaly znatelně vyšší stupeň fluorescence než kratší konjugáty. Avšak nelze to tvrdit obecně, jelikož nižších výsledků dosahovaly jedny z nejdelších PPM. Další zkoumanou vlastností byl náboj peptidu za fyziologického pH. Jak se dalo očekávat, mnohem snáz byly internalizovány sekvence PPM, které měly převažující pozitivní náboj než ty, co je měly negativní nebo neutrální. Nebyl již pozorován razantnější rozdíl mezi více a méně pozitivními PPM. Jako poslední vlastnost byl hodnocen vliv lipofilnosti peptidové sekvence. Hodnota hydropatie peptidu byla získána přidělením hydrofilní hodnoty každé jednotlivé aminokyselině v sekvenci (Hopp a Woods, 1981) a následně byla vypočtena celková hydropatie. V tomto případě nebyly pozorovány větší rozdíly.

Limitem úspěšného použití je také schopnost prostoupit buněčnou membránou bez nenávratného poškození buňky samotné, proto byla konfluentní vrstva HeLa buněk nepřetržitě pozorována pod mikroskopem za použití fázového kontrastu při inkubaci s FAM-PPM konjugáty ve srovnání s kontrolní buněčnou kolonií. Bylo vybráno 5 zástupců, jež po 90 min inkubace dosáhlo nejlepších výsledků, dva z nich navíc neměly žádný vliv na morfologii vrstvy buněk (polylysin 19 a peptid III). U jiných PPM došlo k morfologické změně, konkrétně odlepení buněk od misky, to však nemusí ohrožovat jejich životnost. Nejintenzivnější fluorescence, tedy nejlepších výsledků v dopravě FAM do buňky, dosáhly peptidy: MK2i, inhibitor MAPKAP kinázy II (WLRRIKAWLRRIKALNRQLGVAA; Lopes a kol., 2010), PPM odvozený od antimikrobiálního peptidu dermaseptinu S4 napojený na jaderný lokalizační signál, (VKRKKKPALWKTLLKKVLKA; Hariton-Gazal a kol., 2002) a nově syntetizované modelové peptidy E162, vzniklé připojením peptidových sekvencí k již známým PPM (Hällbrink a kol., 2005), polylysin 19 (KKKKKKKKKKKKKKKKKKKK) a peptid III (KLALKLALKALKAALK; Scheller a kol., 1999). Tato studie vyzdvihla důležitost určitých vlastností a potvrdila i předpokládané výsledky. Důležitější ale je, že provedení experimentu bylo standardizované a jednotné, tedy poskytuje orientaci a snazší použití těchto peptidů v dalším bádání (Ramaker a kol., 2018).

Závěr

Cílené dopravování terapeutik do buněk je ideálem pro mnoho vědeckých skupin, peptidy penetrující membrány hrají v tomto oboru nezanedbatelnou roli, jejich použití je však stále limitováno uvíznutím PPM i s nákladem v endosomu. Pro uvedení do tématu byla první část práce věnována klasifikaci PPM, jež je zároveň neméně důležitá k pochopení mechanismů při vazbě na membrány. Samotná internalizace těchto peptidů je stále se rozvíjejícím odvětvím, proto některé mechanismy doposud nejsou dostatečně objasněny. Navzdory artefaktům metod použitých v dřívějších studiích byla jako nejvyužívanější způsob dopravy potvrzena endocytóza, se všemi svými výhodami i úskalími. Zabránění degradaci v endozomu obsahujícím PPM s připojeným nákladem byly demonstrovány popisem inspirativních metod, jež by podpořily PPM v narušení endozomální membrány a úniku dopravovaného nákladu do cytosolu, popřípadě do jádra.

Ačkoliv mají před sebou tyto terapeuticky využitelné peptidy slibné vyhlídky, existuje ještě mnoho komplikací, jako je nespecifická vazba na buňky, popisovaný únik z endozomu nebo vyvolání imunitní reakce. Všechny tyto nedostatky a třeba i další zatím neznámé, by musely být odstraněny před bezpečným použitím v klinické medicíně. Nicméně poskytují širokou škálu využití za proměnlivých podmínek, které by bylo škoda dále nestudovat. Ačkoliv se již některé PPM testují v II. nebo III. fázích klinických studií, popsané možnosti zefektivnění endozomálního úniku nevyužívají. Snadnějším uvedení do praxe by mohlo posloužit využití počítačových simulátorů chování rozličných biologických systémů *in silico* (simulace molekulární dynamiky všech atomů; z angl. all-atom molecular dynamics simulations), jež mohou předurčit osud, antimikrobiálních PPM na základě jejich struktury při vazbě, přes tvorbu pórů, po samotnou internalizaci do buňky (Patel a kol., 2017). Predikce chování peptidů je založená na kombinaci algoritmů, efektivnosti výpočetní techniky a vylepšených vzorkovacích postupech. Tímto by se dalo urychlit i zlevnit zavedení zde konkrétně antimikrobiálních peptidů (sledované na MAP peptidu tvořícím póry) do klinické praxe. Velká výhoda se skýtá v tom, že simulace je schopna věrohodně napodobit reálnou bakteriální membránu i s jejími odchylkami v zastoupení odlišných lipidů a proteinů na rozdíl od modelových membrán, jež mají omezené možnosti (Patel a kol., 2017). Tato metoda se bohužel zatím omezuje na termostabilní PPM, ale i tento nedostatek se při rychlém technickém pokroku může během následující dekády vyřešit. Zatím byla užitečnost této metody ověřena pouze v porovnání s experimenty *in vitro*. Konečné slovo bude mít jejich porovnání s experimenty na PPM *in vivo* (Ulmschneider a Ulmschneider, 2018).

I po necelých třiceti letech intenzivního zabývání se tímto fenoménem nejsou objasněny všechny potřebné mechanismy k širšímu využití těchto peptidů. Pokud se ale tento trend udrží i do budoucna mohly by s trochou optimismu PPM představovat téměř univerzální řešení k tvorbě nových léčiv.

Seznam použité literatury

- Abuchowski, A., Es, T. van, Palczuk, N.C., and Davis, F.F. (1977). Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* 252, 3578–3581.
- Afonin, S., Frey, A., Bayerl, S., Fischer, D., Wadhvani, P., Weinkauff, S., and Ulrich, A.S. (2006). The Cell- Penetrating Peptide TAT(48- 60) Induces a Non- Lamellar Phase in DMPC Membranes. *ChemPhysChem* 7, 2134–2142.
- Alves, I.D., Goasdoué, N., Correia, I., Aubry, S., Galanth, C., Sagan, S., Lavielle, S., and Chassaing, G. (2008). Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 948–959.
- Åmand, H.L., Rydberg, H.A., Fornander, L.H., Lincoln, P., Nordén, B., and Esbjörner, E.K. (2012). Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1818, 2669–2678.
- Arnt, C.R., Chiorean, M.V., Heldebrant, M.P., Gores, G.J., and Kaufmann, S.H. (2002). Synthetic Smac/DIABLO Peptides Enhance the Effects of Chemotherapeutic Agents by Binding XIAP and cIAP1 in Situ. *J. Biol. Chem.* 277, 44236–44243.
- Avrahami, D., and Shai, Y. (2003). Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 14946–14956.
- Bárány-Wallje Elsa, Gaur Jugnu, Lundberg Pontus, Langel Ülo, and Gräslund Astrid (2007). Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide Tp10 depending on attached cargo. *FEBS Lett.* 581, 2389–2393.
- Berlose, J.-P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A., and Chassaing, G. (1996). Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* 242, 372–386.
- Binder, H., and Lindblom, G. (2003). Interaction of the Trojan peptide penetratin with anionic lipid membranes—a calorimetric study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5, 5108–5117.
- Birch, D., Christensen, M.V., Staerk, D., Franzyk, H., and Nielsen, H.M. (2017). Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1859, 2483–2494.
- Blazyk, J., Wiegand, R., Klein, J., Hammer, J., Epand, R.M., Epand, R.F., Maloy, W.L., and Kari, U.P. (2001). A Novel Linear Amphipathic β -Sheet Cationic Antimicrobial Peptide with Enhanced Selectivity for Bacterial Lipids. *J. Biol. Chem.* 276, 27899–27906.
- Borrelli, A., Tornesello, A.L., Tornesello, M.L., and Buonaguro, F.M. (2018). Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules* 23, 295.

- Borsello, T., Clarke, P.G.H., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D.F., Bogousslavsky, J., and Bonny, C. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat. Med.* 9, 1180–1186.
- Brock, D.J., Kustigian, L., Jiang, M., Graham, K., Wang, T.-Y., Erazo-Oliveras, A., Najjar, K., Zhang, J., Rye, H., and Pellois, J.-P. (2018). Efficient cell delivery mediated by lipid-specific endosomal escape of supercharged branched peptides. *Traffic*.
- Cabantous, S., and Waldo, G.S. (2006). *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nat. Methods* 3, 845–854.
- Cabantous, S., Terwilliger, T.C., and Waldo, G.S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 23, 102–107.
- Carrier, D., and Pézolet, M. (1986). Investigation of polylysine-dipalmitoylphosphatidylglycerol interactions in model membranes. *Biochemistry (Mosc.)* 25, 4167–4174.
- Chen, L., Gan, L., Liu, M., Fan, R., Xu, Z., Hao, Z., and Chen, L. (2011). Destabilization of artificial biomembrane induced by the penetration of tryptophan. *Appl. Surf. Sci.* 257, 5070–5076.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.
- Console, S., Marty, C., García-Echeverría, C., Schwendener, R., and Ballmer-Hofer, K. (2003). Antennapedia and HIV Transactivator of Transcription (TAT) “Protein Transduction Domains” Promote Endocytosis of High Molecular Weight Cargo upon Binding to Cell Surface Glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278, 35109–35114.
- Crombez, L., Morris, M.C., Deshayes, S., Heitz, F., and Divita, G. (2008). Peptide-Based Nanoparticle for Ex Vivo and In Vivo Drug Delivery. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3656–3665.
- Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q.N., McMaster, G.K., Brasseur, R., Heitz, F., and Divita, G. (2009). A New Potent Secondary Amphipathic Cell-penetrating Peptide for siRNA Delivery Into Mammalian Cells. *Mol. Ther.* 17, 95–103.
- Dathe, M., Schumann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., and Bienert, M. (1996). Peptide Helicity and Membrane Surface Charge Modulate the Balance of Electrostatic and Hydrophobic Interactions with Lipid Bilayers and Biological Membranes. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 12612–12622.
- Dathe, M., Meyer, J., Beyermann, M., Maul, B., Hoischen, C., and Bienert, M. (2002). General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1558, 171–186.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.

- Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* *8*, 84–87.
- Deshayes, S., Plénat, T., Aldrian-Herrada, G., Divita, G., Le Grimellec, C., and Heitz, F. (2004a). Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides: Structural Requirements and Interactions with Model Membranes †. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 7698–7706.
- Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M.C., Charnet, P., Divita, G., and Heitz, F. (2004b). Insight into the Mechanism of Internalization of the Cell-Penetrating Carrier Peptide Pep-1 through Conformational Analysis †. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 1449–1457.
- Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G., and Heitz, F. (2005). Interactions of Primary Amphipathic Cell Penetrating Peptides with Model Membranes: Consequences on the Mechanisms of Intracellular Delivery of Therapeutics. *Curr. Pharm. Des. Schiph.* *11*, 3629–3638.
- Deshayes, S., Plénat, T., Charnet, P., Divita, G., Molle, G., and Heitz, F. (2006). Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1758*, 1846–1851.
- Deshayes Sébastien, Morris May C., Divita Gilles, and Heitz Frédéric (2006). Interactions of amphipathic carrier peptides with membrane components in relation with their ability to deliver therapeutics. *J. Pept. Sci.* *12*, 758–765.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic Cph. Den.* *8*, 848–866.
- Dunkin, C.M., Pokorny, A., Almeida, P.F., and Lee, H.-S. (2011). Molecular Dynamics Studies of Transportan 10 (Tp10) Interacting with a POPC Lipid Bilayer. *J. Phys. Chem. B* *115*, 1188–1198.
- Durzyńska, J., Przysiecka, Ł., Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Warowicka, A., Musidlak, O., and Goździcka-Józefiak, A. (2015). Viral and Other Cell-Penetrating Peptides as Vectors of Therapeutic Agents in Medicine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *354*, 32–42.
- Eitzen, G. (2003). Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1641*, 175–181.
- Engin, K., Leeper, D.B., Cater, J.R., Thistlethwaite, A.J., Tupchong, L., and McFarlane, J.D. (1995). Extracellular pH distribution in human tumours. *Int. J. Hyperthermia* *11*, 211–216.
- Erazo-Oliveras, A., Najjar, K., Truong, D., Wang, T.-Y., Brock, D.J., Prater, A.R., and Pellois, J.-P. (2016). The Late Endosome and Its Lipid BMP Act as Gateways for Efficient Cytosolic Access of the Delivery Agent dfTAT and Its Macromolecular Cargos. *Cell Chem. Biol.* *23*, 598–607.
- Falanga, A., Galdiero, M., and Galdiero, S. (2015). Membranotropic Cell Penetrating Peptides: The Outstanding Journey. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 25323–25337.

- Favretto, M.E., Wallbrecher, R., Schmidt, S., van de Putte, R., and Brock, R. (2014). Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors – Bystanders or active players? *J. Controlled Release* *180*, 81–90.
- Fei, L., Yap, L.-P., Conti, P.S., Shen, W.-C., and Zaro, J.L. (2014). Tumor targeting of a cell penetrating peptide by fusing with a pH-sensitive histidine-glutamate co-oligopeptide. *Biomaterials* *35*, 4082–4087.
- Felsher, D.W. (2003). Opinion: Cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 375–379.
- Fillon, Y.A., Anderson, J.P., and Chmielewski, J. (2005). Cell Penetrating Agents Based on a Polyproline Helix Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 11798–11803.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppé, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., and Giacca, M. (2003). Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins. *J. Biol. Chem.* *278*, 34141–34149.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* *55*, 1189–1193.
- Fretz, M.M., Penning, N.A., Al-Taei, S., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Storm, G., and Jones, A.T. (2007). Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochem. J.* *403*, 335–342.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* *276*, 5836–5840.
- Gary, D.J., Min, J.B., Kim, Y., Park, K., and Won, Y.-Y. (2013). The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-Based siRNA Complexes. *Macromol. Biosci.* *13*, 1059–1071.
- Gautam, A., Singh, H., Tyagi, A., Chaudhary, K., Kumar, R., Kapoor, P., and Raghava, G.P.S. (2012). CPPsite: a curated database of cell penetrating peptides. *Database J. Biol. Databases Curation* *2012*.
- Geisler, I., and Chmielewski, J. (2007). Probing length effects and mechanism of cell penetrating agents mounted on a polyproline helix scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *17*, 2765–2768.
- Gennis, R.B. (2013). *Biomembranes: Molecular Structure and Function* (Springer Science & Business Media).
- Gerbai-Chaloin, S., Gondeau, C., Aldrian-Herrada, G., Heitz, F., Gauthier-Rouvière, C., and Divita, G. (2007). First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling. *Biol. Cell* *99*, 223–238.
- Gerweck, L.E., and Seetharaman, K. (1996). Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue: Potential Exploitation for the Treatment of Cancer. *Cancer Res.* *56*, 1194–1198.

- Ghibaudi, E., Boscolo, B., Insera, G., Laurenti, E., Traversa, S., Barbero, L., and Ferrari, R.P. (2005). The interaction of the cell-penetrating peptide penetratin with heparin, heparansulfates and phospholipid vesicles investigated by ESR spectroscopy. *J. Pept. Sci.* *11*, 401–409.
- Gillies, R.J., Raghunand, N., Karczmar, G.S., and Bhujwala, Z.M. (2002). MRI of the tumor microenvironment. *J. Magn. Reson. Imaging* *16*, 430–450.
- Gillmeister, M.P., Betenbaugh, M.J., and Fishman, P.S. (2011). Cellular trafficking and photochemical internalization of cell penetrating peptide linked cargo proteins: A dual fluorescent labeling study. *Bioconjug. Chem.* *22*, 556–566.
- Giuliani, A., Pirri, G., Bozzi, A., Di Giulio, A., Aschi, M., and Rinaldi, A.C. (2008). Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2450–2460.
- Gonçalves, E., Kitas, E., and Seelig, J. (2005). Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 2692–2702.
- Gottschalk, S., Sparrow, J.T., Hauer, J., Mims, M.P., Leland, F.E., Woo, S.L., and Smith, L.C. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther.* *3*, 448–457.
- Green, M., Ishino, M., and Loewenstein, P.M. (1989). Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* *58*, 215–223.
- Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017). Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* *38*, 406–424.
- Hällbrink, M., Kilk, K., Elmquist, A., Lundberg, P., Lindgren, M., Jiang, Y., Pooga, M., Soomets, U., and Langel, Ü. (2005). Prediction of Cell-Penetrating Peptides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* *11*, 249–259.
- Han, X., Bushweller, J.H., Cafiso, D.S., and Tamm, L.K. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 7.
- Hariton-Gazal, E., Feder, R., Mor, A., Graessmann, A., Brack-Werner, R., Jans, D., Gilon, C., and Loyter, A. (2002). Targeting of Nonkaryophilic Cell-Permeable Peptides into the Nuclei of Intact Cells by Covalently Attached Nuclear Localization Signals. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 9208–9214.
- Hedegaard, S.F., Derbas, M.S., Lind, T.K., Kasimova, M.R., Christensen, M.V., Michaelsen, M.H., Campbell, R.A., Jorgensen, L., Franzky, H., Cárdenas, M., Nielsen, H.M. (2018). Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide significantly alters the mode and degree of biomembrane interaction. *Sci. Rep.* *8*, 6327.
- Henriques, S.T., and Castanho, M.A.R.B. (2004). Consequences of Nonlytic Membrane Perturbation to the Translocation of the Cell Penetrating Peptide Pep-1 in Lipidic Vesicles. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 9716–9724.

- Henriques, S.T., and Castanho, M.A.R.B. (2005). Environmental factors that enhance the action of the cell penetrating peptide pep-1 A spectroscopic study using lipidic vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* *1669*, 75–86.
- Henriques, S.T., Costa, J., and Castanho, M.A.R.B. (2005). Re- evaluating the role of strongly charged sequences in amphipathic cell- penetrating peptides. *FEBS Lett.* *579*, 4498–4502.
- Herce, H.D., and Garcia, A.E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 20805–20810.
- Herce, H.D., Garcia, A.E., Litt, J., Kane, R.S., Martin, P., Enrique, N., Rebolledo, A., and Milesi, V. (2009). Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. *Biophys. J.* *97*, 1917–1925.
- Hirose, H., Takeuchi, T., Osakada, H., Pujals, S., Katayama, S., Nakase, I., Kobayashi, S., Haraguchi, T., and Futaki, S. (2012). Transient Focal Membrane Deformation Induced by Arginine-rich Peptides Leads to Their Direct Penetration into Cells. *Mol. Ther.* *20*, 984–993.
- Hitz, T., Iten, R., Gardiner, J., Namoto, K., Walde, P., and Seebach, D. (2006). Interaction of α - and β -Oligoarginine-Acids and Amides with Anionic Lipid Vesicles: A Mechanistic and Thermodynamic Study. *Biochemistry* *45*, 5817–5829.
- Hofmann, K., and Falquet, L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 347–350.
- Hopp, T.P., and Woods, K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 3824–3828.
- Iwasaki, T., Tokuda, Y., Kotake, A., Okada, H., Takeda, S., Kawano, T., and Nakayama, Y. (2015). Cellular uptake and in vivo distribution of polyhistidine peptides. *J. Controlled Release* *210*, 115–124.
- Jähde, E., Rajewsky, M.F., and Baumgärtl, H. (1982). pH Distributions in Transplanted Neural Tumors and Normal Tissues of BDIX Rats as Measured with pH Microelectrodes. *Cancer Res.* *42*, 1498–1504.
- Järver, P., Mäger, I., and Langel, Ü. (2010). In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* *31*, 528–535.
- Jones, S.W., Christison, R., Bundell, K., Voyce, C.J., Brockbank, S.M.V., Newham, P., and Lindsay, M.A. (2005). Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* *145*, 1093–1102.
- Kaddoum, L., Magdeleine, E., Waldo, G.S., Joly, E., and Cabantous, S. (2010). One-step split GFP staining for sensitive protein detection and localization in mammalian cells. *BioTechniques* *49*, 727–728, 730, 732 passim.

- Kaplan, I.M., Wadia, J.S., and Dowdy, S.F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Controlled Release* *102*, 247–253.
- Kawaguchi, Y., Takeuchi, T., Kuwata, K., Chiba, J., Hatanaka, Y., Nakase, I., and Futaki, S. (2016). Syndecan-4 Is a Receptor for Clathrin-Mediated Endocytosis of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides. *Bioconjug. Chem.* *27*, 1119–1130.
- Kenien, R., Zaro, J.L., and Shen, W.-C. (2012). MAP-mediated nuclear delivery of a cargo protein. *J. Drug Target.* *20*, 329–337.
- Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O., and Bechinger, B. (2003). Histidine-Rich Amphipathic Peptide Antibiotics Promote Efficient Delivery of DNA into Mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1564–1568.
- Kichler, A., Mason, A.J., and Bechinger, B. (2006). Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1758*, 301–307.
- Komin, A., Russell, L.M., Hristova, K.A., and Searson, P.C. (2017). Peptide-based strategies for enhanced cell uptake, transcellular transport, and circulation: Mechanisms and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *110–111*, 52–64.
- Koren, E., and Torchilin, V.P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* *18*, 385–393.
- Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., and Futaki, S. (2008). Cellular Internalization and Distribution of Arginine-Rich Peptides as a Function of Extracellular Peptide Concentration, Serum, and Plasma Membrane Associated Proteoglycans. *Bioconjug. Chem.* *19*, 656–664.
- Lawrence, M.S., Phillips, K.J., and Liu, D.R. (2007). Supercharging Proteins Can Impart Unusual Resilience. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 10110–10112.
- Lindberg, M., Jarvet, J., Langel, U., and Gräslund, A. (2001). Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry* *40*, 3141–3149.
- Lis, L.J., McAlister, M., Fuller, N., Rand, R.P., and Parsegian, V.A. (1982). Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. *Biophys. J.* *37*, 657–665.
- Lo, S.L., and Wang, S. (2008). An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* *29*, 2408–2414.
- Lönn, P., Kacsinta, A.D., Cui, X.-S., Hamil, A.S., Kaulich, M., Gogoi, K., and Dowdy, S.F. (2016). Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Sci. Rep.* *6*, 32301.
- Lopes, L.B., Brophy, C.M., Flynn, C.R., Yi, Z., Bowen, B.P., Smoke, C., Seal, B., Panitch, A., and Komalavilas, P. (2010). A Novel Cell Permeant Peptide Inhibitor of MAPKAP Kinase II Inhibits Intimal Hyperplasia in a Human Saphenous Vein Organ Culture Model. *J. Vasc. Surg. Off. Publ. Soc. Vasc. Surg. Int. Soc. Cardiovasc. Surg. North Am.* Chapter 52, 1596–1607.

- Lundberg, M., Wikström, S., and Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol. Ther.* 8, 143–150.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., and Gräslund, A. (2011). Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides.
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1462, 109–140.
- Magzoub, M., Kilk, K., Eriksson, L.E.G., Langel, Ü., and Gräslund, A. (2001). Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1512, 77–89.
- Magzoub, M., Eriksson, L.E.G., and Gräslund, A. (2003). Comparison of the interaction, positioning, structure induction and membrane perturbation of cell-penetrating peptides and non-translocating variants with phospholipid vesicles. *Biophys. Chem.* 103, 271–288.
- Maiolo, J.R., Ottinger, E.A., and Ferrer, M. (2004). Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15376–15377.
- Maiolo, J.R., Ferrer, M., and Ottinger, E.A. (2005). Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1712, 161–172.
- Mason, A.J., Martinez, A., Glaubitz, C., Danos, O., Kichler, A., and Bechinger, B. (2005). The antibiotic and DNA-transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes. *FASEB J.* 20, 320–322.
- Mau, N.V., Vié, V., Chaloin, L., Lesniewska, E., Heitz, F., and Grimellec, C.L. (1999). Lipid-Induced Organization of a Primary Amphipathic Peptide: A Coupled AFM-Monolayer Study. *J. Membr. Biol.* 167, 241–249.
- McCoy, C.L., Parkins, C.S., Chaplin, D.J., Griffiths, J.R., Rodrigues, L.M., and Stubbs, M. (1995). The effect of blood flow modification on intra- and extracellular pH measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy in murine tumours. *Br. J. Cancer* 72, 905–911.
- McNaughton, B.R., Cronican, J.J., Thompson, D.B., and Liu, D.R. (2009). Mammalian cell penetration, siRNA transfection, and DNA transfection by supercharged proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6111–6116.
- Menestrina, G., and Sera, M.D. (2005). *Pore-forming Peptides and Protein Toxins* (CRC Press).
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* 17, 850–860.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1173–1176.

- Mousavi, S.A., Malerød, L., Berg, T., and Kjekken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* *377*, 1–16.
- Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., and Boisguerin, P. (2008). Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjug. Chem.* *19*, 2363–2374.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones A.T., Sugiura Y., Futaki S. (2004). Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement. *Mol. Ther.* *10*, 1011–1022.
- Nekhotiaeva, N., Elmquist, A., Rajarao, G.K., Hällbrink, M., Langel, Ü., and Good, L. (2003). Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *FASEB J.* *18*, 394–396.
- Nguyen, T.V., Shin, M.C., Min, K.A., Huang, Y., Oh, E., and Moon, C. (2018). Cell-penetrating peptide-based non-invasive topical delivery systems. *J. Pharm. Investig.* *48*, 77–87.
- Oehlke, J., Krause, E., Wiesner, B., Beyermann, M., and Bienert, M. (1997). Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic β -sheet forming peptide. *FEBS Lett.* *415*, 196–199.
- Palm-Apergi, C., Lönn, P., and Dowdy, S.F. (2012). Do Cell-Penetrating Peptides Actually “Penetrate” Cellular Membranes? *Mol. Ther.* *20*, 695–697.
- Patel, D.S., Qi, Y., and Im, W. (2017). Modeling and simulation of bacterial outer membranes and interactions with membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *43*, 131–140.
- Pelkmans, L., and Helenius, A. (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic Cph. Den.* *3*, 311–320.
- Plénat, T., Deshayes, S., Boichot, S., Milhiet, P.E., Cole, R.B., Heitz, F., and Le Grimmellec, C. (2004). Interaction of Primary Amphipathic Cell-Penetrating Peptides with Phospholipid-Supported Monolayers. *Langmuir* *20*, 9255–9261.
- Potocky, T.B., Menon, A.K., and Gellman, S.H. (2003). Cytoplasmic and Nuclear Delivery of a TAT-derived Peptide and a β -Peptide after Endocytic Uptake into HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 50188–50194.
- Prochiantz, A. (1996). Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr. Opin. Neurobiol.* *6*, 629–634.
- Prochiantz, A. (2000). Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 400–406.
- Räägel, H., Hein, M., Kriiska, A., Säälk, P., Florén, A., Langel, Ü., and Pooga, M. (2013). Cell-penetrating peptide secures an efficient endosomal escape of an intact cargo upon a brief photo-induction. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 4825–4839.
- Ramaker, K., Henkel, M., Krause, T., Röckendorf, N., and Frey, A. (2018). Cell penetrating peptides: a comparative transport analysis for 474 sequence motifs. *Drug Deliv.* *25*, 928–937.

- Reissmann, S. (2014). Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Pept. Sci.* *20*, 760–784.
- Repke, H., and Bienert, M. (1987). Mast cell activation — a receptor-independent mode of substance P action? *FEBS Lett.* *221*, 236–240.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating Peptides A REEVALUATION OF THE MECHANISM OF CELLULAR UPTAKE. *J. Biol. Chem.* *278*, 585–590.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L.V. (2005). Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors. *J. Biol. Chem.* *280*, 15300–15306.
- Richter, R.P., Bérat, R., and Brisson, A.R. (2006). Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* *22*, 3497–3505.
- Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R., and Jacobs, E. (2002). New Basic Membrane-Destabilizing Peptides for Plasmid-Based Gene Delivery in Vitro and in Vivo. *Mol. Ther.* *5*, 104–114.
- Roberts, M.J., Bentley, M.D., and Harris, J.M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *18*.
- Rothbard, J.B., Jessop, T.C., Lewis, R.S., Murray, B.A., and Wender, P.A. (2004). Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 9506–9507.
- Roux, M., Neumann, J.M., Hodges, R.S., Devaux, P.F., and Bloom, M. (1989). Conformational changes of phospholipid headgroups induced by a cationic integral membrane peptide as seen by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry* *28*, 2313–2321.
- Rudolph, C., Plank, C., Lausier, J., Schillinger, U., Müller, R.H., and Rosenecker, J. (2003). Oligomers of the Arginine-rich Motif of the HIV-1 TAT Protein Are Capable of Transferring Plasmid DNA into Cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 11411–11418.
- Sadler, K., Eom, K.D., Yang, J.-L., Dimitrova, Y., and Tam, J.P. (2002). Translocating Proline-Rich Peptides from the Antimicrobial Peptide Bactenecin 7. *Biochemistry (Mosc.)* *41*, 14150–14157.
- Scheller, A., Oehlke, J., Wiesner, B., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Melzig, M., and Bienert, M. (1999). Structural requirements for cellular uptake of α -helical amphipathic peptides. *J. Pept. Sci.* *5*, 185–194.
- Schmidt, S., Adjobo-Hermans, M.J.W., Kohze, R., Enderle, T., Brock, R., and Milletti, F. (2016). Identification of Short Hydrophobic Cell-Penetrating Peptides for Cytosolic Peptide Delivery by Rational Design.
- Selbo, P. (2000). Release of gelonin from endosomes and lysosomes to cytosol by photochemical internalization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1475*, 307–313.

- Selbo, P.K., Weyergang, A., Høgset, A., Norum, O.-J., Berstad, M.B., Vikdal, M., and Berg, K. (2010). Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *J. Controlled Release* *148*, 2–12.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1462*, 55–70.
- Sharonov, A., and Hochstrasser, R.M. (2007). Single-Molecule Imaging of the Association of the Cell-Penetrating Peptide Pep-1 to Model Membranes [†]. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 7963–7972.
- Skehel, J.J., Cross, K., Steinhauer, D., and Wiley, D.C. (2001). Influenza fusion peptides. *4*.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., and Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1467*, 165–176.
- Srinivasan, D., Muthukrishnan, N., Johnson, G.A., Erazo-Oliveras, A., Lim, J., Simanek, E.E., and Pellois, J.-P. (2011). Conjugation to the Cell-Penetrating Peptide TAT Potentiates the Photodynamic Effect of Carboxytetramethylrhodamine. *PLOS ONE* *6*, e17732.
- Terrone, D., Sang, S.L.W., Roudaia, L., and Silviu, J.R. (2003). Penetratin and Related Cell-Penetrating Cationic Peptides Can Translocate Across Lipid Bilayers in the Presence of a Transbilayer Potential [†]. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 13787–13799.
- Thennarasu, S., Tan, A., Penumatchu, R., Shelburne, C.E., Heyl, D.L., and Ramamoorthy, A. (2010). Antimicrobial and Membrane Disrupting Activities of a Peptide Derived from the Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37. *Biophys. J.* *98*, 248–257.
- Tiriveedhi, V., and Butko, P. (2007). A Fluorescence Spectroscopy Study on the Interactions of the TAT-PTD Peptide with Model Lipid Membranes. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 3888–3895.
- Torgerson, T.R., Colosia, A.D., Donahue, J.P., Lin, Y.-Z., and Hawiger, J. (1998). Regulation of NF- κ B, AP-1, NFAT, and STAT1 Nuclear Import in T Lymphocytes by Noninvasive Delivery of Peptide Carrying the Nuclear Localization Sequence of NF- κ B p50. *J. Immunol.* *161*, 6084–6092.
- Tünnemann, G., Martin, R.M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F., and Cardoso, M.C. (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J.* *20*, 1775–1784.
- Ulmschneider, J.P., and Ulmschneider, M.B. (2018). Molecular Dynamics Simulations Are Redefining Our View of Peptides Interacting with Biological Membranes. *Acc. Chem. Res.*
- Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., and Beaumelle, B. (2004). HIV-1 Tat Enters T Cells Using Coated Pits before Translocating from Acidified Endosomes and Eliciting Biological Responses. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2347–2360.
- Verdurmen, W.P.R., and Brock, R. (2011). Biological responses towards cationic peptides and drug carriers. *Trends Pharmacol. Sci.* *32*, 116–124.

- Verdurmen, W.P.R., Bovee-Geurts, P.H., Wadhvani, P., Ulrich, A.S., Hällbrink, M., van Kuppevelt, T.H., and Brock, R. (2011). Preferential Uptake of L- versus D-Amino Acid Cell-Penetrating Peptides in a Cell Type-Dependent Manner. *Chem. Biol.* *18*, 1000–1010.
- Vié, V., Van Mau, N., Chaloin, L., Lesniewska, E., Le Grimellec, C., and Heitz, F. (2000). Detection of Peptide-Lipid Interactions in Mixed Monolayers, Using Isotherms, Atomic Force Microscopy, and Fourier Transform Infrared Analyses. *Biophys. J.* *78*, 846–856.
- Vives, E., Richard, J.-P., and Lebleu, C.R. and B. (2003). TAT Peptide Internalization: Seeking the Mechanism of Entry.
- Wadia, J.S., Stan, R.V., and Dowdy, S.F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* *10*, 310–315.
- White, S.H., and Wimley, W.C. (1994). Peptides in lipid bilayers: structural and thermodynamic basis for partitioning and folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *4*, 79–86.
- Wieprecht, T., Beyermann, M., and Seelig, J. (2002). Thermodynamics of the coil- α -helix transition of amphipathic peptides in a membrane environment: the role of vesicle curvature. *Biophys. Chem.* *96*, 191–201.
- Working, P.K., Newman, M.S., Johnson, J., and Cornacoff, J.B. (1997). Safety of Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene glycol) Derivatives. In *Poly(Ethylene Glycol)*, (American Chemical Society), pp. 45–57.
- Yandek, L.E., Pokorny, A., Florén, A., Knoelke, K., Langel, U., and Almeida, P.F.F. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys. J.* *92*, 2434–2444.
- Yandek, L.E., Pokorny, A., and Almeida, P.F.F. (2008). Small Changes in the Primary Structure of Transportan 10 Alter the Thermodynamics and Kinetics of its Interaction with Phospholipid Vesicles. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 3051–3060.
- Ye, J., Liu, E., Yu, Z., Pei, X., Chen, S., Zhang, P., Shin, M.-C., Gong, J., He, H., and Yang, V.C. (2016). CPP-Assisted Intracellular Drug Delivery, What Is Next? *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Young Kim, H., Young Yum, S., Jang, G., and Ahn, D.-R. (2015). Discovery of a non-cationic cell penetrating peptide derived from membrane-interacting human proteins and its potential as a protein delivery carrier. *Sci. Rep.* *5*, 11719.
- Zaro, J.L., and Shen, W.-C. (2015). Cationic and amphipathic cell-penetrating peptides (CPPs): Their structures and in vivo studies in drug delivery. *Front. Chem. Sci. Eng.* *9*, 407–427.
- Zaro, J.L., Fei, L., and Shen, W.-C. (2012). Recombinant peptide constructs for targeted cell penetrating peptide-mediated delivery. *J. Controlled Release* *158*, 357–361.
- Zhao, Q.-Q., Chen, J.-L., Lv, T.-F., He, C.-X., Tang, G.-P., Liang, W.-Q., Tabata, Y., and Gao, J.-Q. (2009). N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biol. Pharm. Bull.* *32*, 706–710.

Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *60*, 580–597.

Ziegler, A., Li Blatter, X., Seelig, A., and Seelig, J. (2003). Protein Transduction Domains of HIV-1 and SIV TAT Interact with Charged Lipid Vesicles. Binding Mechanism and Thermodynamic Analysis. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 9185–9194.