



Doctoral Thesis

Cell penetrating peptides: Uptake, permeation and metabolism in epithelial models

Author(s):

Tréhin, Rachel

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004692006> →

Rights / License:

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

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

Dissertation. ETH No. 15314

**Cell penetrating peptides: Uptake, permeation
and metabolism in epithelial models**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Rachel Tréhin

Biochemist, Université de Rennes I

born 02.02.1974
citizen of France

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner
Prof. Dr. K. Ballmer-Hofer, co-examiner
Dr. H. Mørck Nielsen, co-examiner

2003

Abstract

Cell penetrating peptides (CPP), featuring the ability to rapidly translocate the plasma membrane of eukaryotic cells, have opened new expectations in intracellular drug delivery over the past years. This thesis mainly studies human calcitonin (hCT) derived CPP and focuses on three major aspects: uptake, permeation and metabolism of these peptide sequences in contact with epithelial cell layers. For comparison, recognized CPP are also included, namely Tat(47-57) and penetratin(43-58).

In the first chapter, we review some general properties of the most commonly used classes of CPP. From this perspective, mechanisms of internalization as well as types of macromolecular cargos transported were considered. In addition, we point out some limitations and typical pitfalls of CPP as carriers for therapeutics. Despite the fact that the exact mechanisms of CPP translocation across the cellular membrane is still poorly understood, several similarities in translocation can be found. Early studies tended to suggest that the internalization of these peptides was neither significantly inhibited by low temperature, depletion of the cellular ATP pool, nor by inhibitors of endocytosis. Moreover, chemical modification of the peptide sequence, such as the synthesis of *retro*-, *enantio*- or *retroenantio*-analogs, appeared not to affect the internalization properties. Therefore, translocation was concluded to result from direct, physical transfer through the lipid bilayer of the cell membrane. Later studies, however, showed convincing evidence for the involvement of endocytosis as the dominating mechanism for cellular internalization. Other discrepancies, such as cell-to-cell variability, non-permeability of biological barriers, metabolic degradation or even cellular toxicity underline the need for a reassessment of the prevailing dogma.

Previous studies in our group demonstrated the ability of the C-terminal fragment of human calcitonin (hCT) featuring residues 9 to 32, i.e. hCT(9-32), to translocate the plasma membrane of bovine nasal epithelium *in vitro* and to

act even as a vector for the translocation of the green fluorescent protein (GFP) into this model. In the second chapter of this work, we intend to uncover key motif requirements of hCT derived peptides needed for efficient translocation across the plasma membrane of Madin-Darby canine kidney (MDCK) monolayers, which is a meaningful cellular model for columnar-type epithelia. Our results show that truncated sequences of hCT, from hCT(9-32) to hCT(18-32), translocate the plasma membrane and demonstrate a sectoral, punctuated cytoplasmic distribution. The translocation efficiency of the peptides decreases in the order of $\text{hCT}(9-32) \approx \text{hCT}(12-32) > \text{hCT}(15-32) > \text{hCT}(18-32)$. The uptake process appears to be temperature-, time- and concentration-dependent. Subsequent amino acid modifications of hCT(18-32) indicates that both the proline in position 23 and the positive charge of lysine in position 18 are crucial for peptide uptake. The reverse sequence hCT(32-18) does not penetrate the membrane, indicating the importance of sequence orientation. In the same chapter, the uptake efficiency of both Tat(47-57) and penetratin(43-58) is assessed as a direct comparison with hCT derived peptides. A similar punctuated cytoplasmic distribution of these two peptides in both MDCK and HeLa cell lines was observed. Finally, there is strong evidence that implicates endocytosis to represent the common mechanism for efficient peptide translocation of all the tested CPP.

The third chapter of this thesis focuses on the uptake of hCT(9-32), Tat(47-57) and penetratin(43-58) in two further epithelial models - in addition to MDCK monolayers - namely Calu-3 monolayers as a surrogate of the human bronchial epithelium, and TR146 multilayers, featuring typical characteristics of the human buccal epithelium. Both Tat(47-57) and penetratin(43-58) depicted a punctuated cytoplasmic and paracellular distribution in Calu-3 cells, while hCT(9-32) showed a clear paracellular distribution. Contrastingly, Tat(47-57) appeared strictly paracellular in TR146 cells, whereas penetratin(43-58) showed a punctuated cytoplasmic pattern. In this model, hCT(9-32) demonstrated both,

some degree of punctuated cytoplasmic and paracellular distribution. Thus, the uptake of the investigated CPP by epithelial models is peptide and cell line dependent. In order to further assess the capability of the tested CPP to permeate through epithelial barriers, i.e. to evaluate their potential for systemic drug delivery, their permeability was also evaluated in all three epithelial models. Within the study time of six hours, the observed permeability coefficients of the tested CPP peptides were similar or even lower than those of recognized markers of comparable molecular weights for passive, paracellular transport. Therefore, the investigated CPP sequences show no apparent potential for systemic drug delivery across epithelia. Nevertheless, the distinct patterns of cellular localization in either MDCK, Calu-3 or TR146 may offer potential for localized epithelial drug delivery. When assessed for acute toxicity, none of the tested CPP, except penetratin(43-58) on TR146, showed any toxicity in the three epithelial models at concentrations as high as 100 μ M during 24 hours. At a concentration of 1 mM though, Tat(47-57) and penetratin(43-58) exhibited marked toxicity in all three models, very likely because of their polycationic nature.

Metabolic stability of CPP is an important biopharmaceutical factor for cellular bioavailability, since the peptides should carry their cargo to the target before they are metabolically cleaved. Therefore, we studied in the last chapter of this thesis the metabolic degradation of hCT derived peptides, Tat(47-57) and penetratin(43-58) in contact with MDCK, Calu-3 and TR146 epithelial models. The level of proteolytic activity was highly variable between the different epithelial models and compounds. The Calu-3 model exhibited the highest proteolytic activity resulting in half-lives for the majority of the tested compounds being in the range of 15 to 45 min. In large contrast was Tat(47-57) with a half-life of 544 min in the Calu-3 model. The pattern of metabolic degradation of hCT(9-32) was similar in all three models. Initial cleavage of this peptide was observed to occur in the N-terminal domain, possibly by

endopeptidase activity yielding both the N-terminal and the C-terminal counterparts. Further metabolic degradation was done by aminopeptidase, endopeptidase and/or carboxypeptidase activities.

In conclusion, we propose a new family of modestly cationic peptides derived from human calcitonin, featuring the ability to translocate the plasma membrane of selected epithelial cell line models. Their minor permeation across epithelial barriers offers the potential to apply them for localized epithelial drug delivery. To successfully overcome the enzymatic barrier of the cellular membrane, tailored modifications of the hCT(9-32) sequence are suggested to improve its metabolic stability.

Résumé

Les peptides pénétrants les cellules (cell penetrating peptides ou CPP) ont la capacité de rapidement traverser la membrane cytoplasmique des cellules eukaryotes. Au cours des dernières années, ceux-ci ont ouvert de nouveaux espoirs en matière de vecteurs pour le transport de médicaments à l'intérieur des cellules. Cette thèse s'est plus particulièrement intéressée aux CPP dérivés de la calcitonine humaine (hCT), à Tat(47-57) et à penetratin(43-58) et s'est orientée autour de trois aspects fondamentaux : l'entrée cellulaire, la perméabilité et la dégradation métabolique de ces séquences peptidiques au contact de barrières épithéliales.

Dans un premier chapitre, nous passons en revue les propriétés générales des CPP les plus étudiés. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes d'entrée cellulaire, aux types de composés transportés ainsi qu'aux limitations biologiques de leurs applications. Bien que le mécanisme exact d'entrée cellulaire soit encore peu connu, plusieurs similarités ont été mises en évidence entre les différents CPP. Dans un premier temps, certains travaux ont suggérés que ces séquences peptidiques traversaient la membrane cytoplasmique par un mécanisme indépendant de la température et que l'absence d'ATP ou la présence d'inhibiteurs de l'endocytose ne permettait pas de bloquer leur entrée cellulaire. De plus, des modifications chimiques des séquences peptidiques, telles que la synthèse d'analogues *retro*, *énantio* et *retroénantio*, n'affectaient en rien les propriétés d'entrée cellulaire. Il a alors été conclu que les CPP traversaient la membrane cytoplasmique par transfert direct au travers des lipides membranaires. Cependant, de récentes études contrastent largement ce modèle et semblent montrer que l'endocytose est bel et bien partie prenante de l'entrée cellulaire. D'autres contradictions telles que, la dépendance cellulaire, la non-perméabilité au travers des barrières biologiques, la dégradation métabolique et la toxicité ont remis en question le dogme actuel.

Des études précédemment effectuées dans notre laboratoire ont démontré la capacité du fragment C-terminal de la hCT, délimité par les acides aminés 9 et 32 et nommé hCT(9-32), de traverser la membrane plasmique des cellules d'épithélium nasal bovin et de transporter la protéine fluorescente verte, appelée GFP, dans le compartiment intracellulaire des cellules sus-mentionnées. Dans le second chapitre de cette étude, nous nous intéressons à déterminer les motifs peptidiques indispensables qui soutiennent l'entrée cellulaire des peptides dérivés de la hCT. Ces expériences ont été réalisées sur la lignée Madin-Darby canine kidney (MDCK), une mono-couche cellulaire d'épithélium rénal. Ce modèle a été retenu comme modèle général d'épithélium palissadique. Nos résultats montrent que parmi les différents fragments peptidiques, hCT(9-32), hCT(12-32), hCT(15-32) et hCT(18-32) traversaient la membrane cytoplasmique et se retrouvaient localisés de façon sectoriel à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques. Leur efficacité d'entrée cellulaire s'est avérée décroissante selon l'ordre suivant : hCT(9-32) \approx hCT(12-32) > hCT(15-32) > hCT(18-32). De plus, leur mécanisme d'entrée cellulaire s'est révélé être dépendent de la température, du temps d'incubation ainsi que de la concentration peptidique. Des modifications apportées à la séquence hCT(18-32) ont souligné l'importance de la proline en position 23, ainsi que de la charge positive portée par la lysine en position 18. Ne pénétrant pas la membrane cytoplasmique, la séquence inversée hCT(32-18) a mis en évidence le rôle crucial de l'orientation de cette séquence. Dans ce même chapitre, nous nous sommes également intéressés à l'entrée cellulaire de Tat(47-57) et de penetratin(43-58), afin d'établir une comparaison avec les peptides dérivés de la hCT. Ces deux séquences ont également été localisées à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques des cellules MDCK et HeLa, suggérant ainsi l'endocytose comme mécanisme commun d'entrée cellulaire de toutes ces séquences peptidiques.

Dans le troisième chapitre de cette thèse, nous avons étudié l'entrée cellulaire des fragments hCT(9-32), Tat(47-57) et penetratin(43-58) dans deux autres modèles de barrières épithéliales que sont Calu-3 et TR146. Calu-3 et TR146 représentent tous deux des modèles humains d'épithélium, respectivement des bronches et de la cavité buccale. Au contact de Calu-3, Tat(47-57) et penetratin(43-58) ont été localisés à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques ainsi qu'à l'extérieur des cellules. En revanche, hCT(9-32) était clairement localisé à l'extérieur des cellules. Au contact de TR146, Tat(47-57) n'était situé qu'à l'extérieur des cellules, alors que penetratin(43-58) était exclusivement présent à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques. Quant à hCT(9-32), sa présence a été faiblement détectée à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques et de façon plus intense à l'extérieur des cellules. Pris ensemble, ces résultats témoignent clairement d'une distribution peptidique dépendante des modèles cellulaires étudiés. Afin de déterminer si les CPP présentement étudiés pourraient être utilisés comme vecteurs pour le transport de médicaments au travers d'une barrière épithéliale, une étude de leur perméabilité au travers de chacun des trois épithéliums à disposition a été menée. Après six heures d'étude, les valeurs des coefficients de perméabilité des CPP se sont avérées être inférieures ou égales à celles de marqueurs moléculaires de masses semblables que l'on utilise couramment pour illustrer le transport paracellulaire. Nous pouvons donc conclure que ces fragments peptidiques ne peuvent être retenus pour le transport de médicaments aux travers des épithéliums. Néanmoins, la localisation intracellulaire de certaines de ces séquences dans MDCK, Calu-3 ou TR146 offre la possibilité de les utiliser comme vecteurs pour le transport de médicaments à l'intérieur de cellules épithéliales. Une étude menée sur la toxicité n'a démontré aucune toxicité cellulaire des CPP testés sur une période de 24 heures et à une concentration de 100 μM , à l'exception de penetratin(43-58) incubé en présence des cellules TR146. A une concentration de 1 mM, les peptides Tat(47-57) et penetratin(43-58) exerçaient toutefois une forte toxicité.

La stabilité métabolique des CPP est un facteur important qui doit être étudié afin d'estimer les capacités de ces derniers à transporter un médicament jusqu'à sa cible avant d'être dégradé. Par conséquent, nous nous sommes intéressés dans le chapitre IV à la dégradation métabolique des peptides dérivés de la hCT, de Tat(47-57) et de penetratin(43-58) au contact des trois épithéliums. Tat(47-57) s'est avéré être le peptide le plus stable parmi toutes les séquences étudiées. L'activité des peptidases était différente dans chaque lignée cellulaire et Calu-3 a montré le niveau d'activité le plus élevé impliquant une importante dégradation peptidique. La majorité des valeurs de demi-vie se situaient entre 15 et 45 minutes pour les composés incubés avec Calu-3. Seul Tat(47-57) présentait une demi-vie de 544 minutes. Le profil de dégradation de hCT(9-32) s'est avéré être très similaire dans les trois modèles cellulaires, présentant tout d'abord une dégradation du côté N-terminal issue d'activité endopeptidique. Cette première étape de dégradation s'ensuit par des réactions de dégradation due à des aminopeptidases, endopeptidases et autres carboxypeptidases.

Pour conclure, nous proposons une nouvelle famille de peptides modestement cationiques, tous dérivés de la hCT et capable de traverser la membrane plasmique de certains modèles d'épithélium. Leur modeste perméabilité au travers de ces barrières les présente comme d'intéressantes séquences pour un apport local de médicaments. Afin d'éviter une importante dégradation métabolique du peptide hCT(9-32), des modifications chimiques de sa séquence sont suggérées.