



Doctoral Thesis

## Cellular translocation, trafficking and metabolic cleavage of novel cell penetrating peptides

**Author(s):**

Förg, Christina

**Publication Date:**

2006

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005212940> →

**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.16569

**Cellular translocation, trafficking and metabolic cleavage  
of novel cell penetrating peptides**

A dissertation submitted to the  
**Swiss Federal Institute of Technology Zurich**  
for the degree of  
Doctor of Sciences  
(Dr. sc. ETH)

presented by  
**Christina Förg**

Pharmacist  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
born on Dec 16<sup>th</sup>, 1977  
citizen of Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H.P. Merkle, examiner  
Prof. Dr. Ernest Giralt, co-examiner  
Dr. Urs Ziegler, co-examiner

2006

**ABSTRACT**

Over the last decade, marked improvements in the cellular delivery of various biologically active molecules have been achieved upon chemical or physical ligation to so-called cell-penetrating peptides (CPPs), denoting peptides with the capacity to translocate the plasma membrane of mammalian cells. This PhD thesis mainly studies two recently developed CPPs, namely SAP and hCT(9-32)-br. For comparison, other established CPPs are also included, namely the Tat peptide as well as the linear hCT derived peptide hCT(9-32), and two members of the MPG family, [P $\alpha$ ] and [P $\beta$ ].

The *first chapter* presents a selection of representative CPP families and cargo molecules that have been efficiently delivered by the CPP approach. From this perspective, mechanisms of internalization as well as intracellular trafficking routes were considered. The focus of this review is to revisit the performance of cell penetrating peptides for drug delivery. To this aim we cover both accomplishments and failures and we report on new prospects of the CPP approach. Besides a selection of successful case histories of CPPs we also review the limitations of CPP mediated translocation. In particular, we comment on the impact of (i) metabolic degradation, (ii) the cell line and cellular differentiation state dependent uptake of CPPs as well as (iii) the regulation of their endocytic traffic by Rho-family GTPases. Further on, we aim at the identification of promising niches for CPP application in drug delivery. In this context, as inspired by current literature, we focus on three principal areas: (i) the delivery of antineoplastic agents, (ii) the delivery of CPPs as antimicrobials, and (iii) the potential of CPPs to target inflammatory tissue.

Despite increasing evidence for the involvement of endocytosis in the internalization of CPPs, the exact mechanism underlying the translocation of CPPs across the cellular membrane is still not completely understood. In the *second chapter* of the PhD thesis, we study translocation efficiency and mechanism as well as intracellular trafficking of SAP and hCT(9-32)-br into HeLa cells using biochemical markers in combination with quenching and colocalization approaches. Both peptides were readily internalized by HeLa cells through interaction with the extracellular matrix followed by lipid raft-mediated endocytosis. This was confirmed by reduced uptake at lower temperatures, in the presence of endocytosis inhibitors and through cholesterol depletion by methyl- $\beta$ -cyclodextrin, supported by colocalization with markers for clathrin-independent pathways. In contrast to the oligocationic CPPs SAP and hCT(9-32)-br, interaction with the extracellular matrix, however, was no prerequisite for the observed lipid raft-mediated uptake of the weakly cationic, unbranched hCT(9-32). Transient involvement of endosomes in the intracellular trafficking of SAP and hCT(9-32)-br prior to

endosomal escape of both peptides was revealed by colocalization and pulse-chase studies of the peptides with the early endosome antigen1.

Metabolic stability of CPPs is an important biopharmaceutical factor for cellular bioavailability, since the peptides should be stable enough to carry their cargo to the target before they are metabolically cleaved. Therefore, we studied in the *third chapter* of this thesis the metabolic degradation of four recently developed CPPs. Besides SAP and hCT(9-32)-br, we investigated [P $\alpha$ ] and [P $\beta$ ], when in contact with three epithelial cell cultures, consisting of either subconfluent HeLa or confluent MDCK or Calu-3 cells. Additionally, through analysis of their cellular translocation, we aimed to reveal possible relation between metabolic stability and translocation efficiency. Between HeLa, MDCK and Calu-3 we found the levels of proteolytic activities to be highly variable. However, for each peptide, the individual patterns of metabolic degradation were quite similar. The metabolic stability of the investigated CPPs was in the order of CF-SAP = CF-hCT(9-32)-br > [P $\beta$ ]-IAF > [P $\alpha$ ]. We were further able to identify specific cleavage sites for each of the four peptides. For all investigated CPPs, we observed higher translocation efficiencies into HeLa cells as compared to MDCK and Calu-3, corresponding to the lower state of differentiation of HeLa cell cultures. For the four CPPs, there was no direct relation between metabolic stability and translocation efficiency. These results indicate that metabolic stability is not a main limiting factor for efficient cellular translocation. Nevertheless, the translocation of individual CPPs may be improved by structural modifications aiming at increased metabolic stability.

In the *forth chapter* of this thesis, we emphasize the importance of differentiated cell models to study CPP translocation, and, moreover, we point towards inflamed epithelia as potential niches for CPP application in drug delivery. We observed marked endocytic uptake of the two CPPs SAP and hCT(9-32)-br into proliferating MDCK cells by a mechanism involving both lipid rafts and clathrin-coated pits. In well-differentiated, confluent MDCK monolayers, however, we noted a massive slow-down of compound-unspecific endocytosis. The underlying mechanism is the down-regulation of endocytosis by Rho-GTPases that have been previously identified to be intimately involved in endocytic traffic. In fact, we found a correlation between endocytic translocation and active form Rho-A, as well as a correlation between cell density, cellular differentiation and endocytic slow-down on the one hand, and active form Rac-1 on the other. To our knowledge, this is the first study to cast light on the underlying mechanisms for the differentiation-restricted translocation of CPPs into epithelial cell models. Our findings were further elaborated using an inflammatory epithelial, IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  induced MDCK model mimicking inflammatory epithelial diseases. CPP

---

translocation in the inflammatory model was enhanced in a cytokine concentration-dependent way, resulting in maximum enhancement rates of up to 90 %. Interestingly, our observations suggest a cytokine-induced redistribution of lipid rafts in confluent MDCK layers to be involved in the observed enhancement of CPP translocation.

In conclusion, we describe in this PhD thesis the cellular translocation mechanism, the intracellular trafficking and the metabolic cleavage of two recently developed CPPs, SAP and hCT(9-32)-br, into epithelial cell cultures. As compared to other CPPs, e.g. the Tat peptide, both peptides show the advantage of negligible cytotoxicity and high metabolic stability. The finding of their lipid raft-mediated uptake into HeLa cells adds evidence to the suggestion of a common endocytic translocation mechanism of CPPs. With regard to cellular barriers to CPP internalization, we suggest inflamed epithelia as potential niches for a therapeutic application of CPPs in drug delivery.

## ZUSAMMENFASSUNG

Im Laufe des letzten Jahrzehnts konnte die gezielte zelluläre Freisetzung verschiedener biologisch aktiver Moleküle dadurch verbessert werden, dass sie auf chemischem oder physikalischem Wege an sogenannte Zellpenetrierende Peptide (ZPPs) gekoppelt wurden. Diese Zellpenetrierenden Peptide sind in der Lage, die Plasmamembran von Säugetierzellen zu überwinden. Die vorliegende Dissertation befasst sich vornehmlich mit den beiden neu entwickelten ZPPs SAP und hCT(9-32)-br. Andere, bereits gut erforschte, ZPPs wie das Tat-Peptid, das lineare hCT(9-32) sowie die zwei MPG Peptide [P $\alpha$ ] und [P $\beta$ ] wurden zu Vergleichszwecken herangezogen.

Das erste Kapitel stellt eine Auswahl etablierter ZPP-Familien dar und präsentiert eine Reihe von „Cargo-Molekülen“, die bereits effizient durch ZPPs in Zellen transportiert werden konnten. In diesem Zusammenhang werden Aufnahmemechanismen sowie die intrazelluläre Wanderung der Peptide betrachtet. Dieses Überblickskapitel beschäftigt sich hauptsächlich mit der Effizienz von ZPPs bei der gezielten zellulären Freisetzung biologisch aktiver Moleküle. Dabei gehen wir neben einer Auswahl an positiven Beispielen auch auf die Grenzen des ZPP-Ansatzes ein. Insbesondere interessiert uns hierbei der Einfluss auf die ZPP-Aufnahme, den (i) die Metabolisierung, (ii) die jeweiligen Zelllinien und der zellulären Differenzierungsstatus sowie (iii) die Regulierung der Endozytose durch Rho-GTPasen haben. Im Ausblick präsentieren wir weiterhin viel versprechende Nischen für die zukünftige Anwendung von ZPPs. Bezug nehmend auf aktuelle Literatur beschäftigen wir uns dabei hauptsächlich mit den drei Gebieten Antitumorthherapie, antimikrobieller Anwendung sowie dem Potential von ZPPs im Einsatz gegen entzündete Epithelien.

Trotz vermehrter Hinweise auf die Beteiligung von Endozytose an der zellulären Aufnahme von ZPPs ist der genaue Mechanismus, der diesem Prozess zugrunde liegt, noch nicht vollständig geklärt. Im 2. Kapitel dieser Arbeit beschäftigen wir uns mit Aufnahmeeffizienz und -mechanismus sowie mit der Wanderung der Peptide SAP und hCT(9-32)-br in HeLa Zellen. Hierbei wurden Zellorganellen biochemisch gekennzeichnet und „Quenching“- und Kollokalisationsmethoden herangezogen. Beide Peptide wurden nach Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix und der folgenden „lipid raft“-Endozytose effizient in HeLa Zellen aufgenommen. Dies wurde bestätigt durch reduzierte Aufnahme bei niedrigen Temperaturen, bei Zugabe von Endozytose-Hemmstoffen und bei einer Verringerung des Cholesterinanteils. Weitere Belege für diese These liefern Kollokalisationsstudien mit Fluoreszenzmarkern für einen Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg. Im Unterschied zu den oligokationischen ZPPs SAP und hCT(9-32)-br ist

jedoch die Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix keine Notwendigkeit für die Aufnahme des schwach kationischen, linearen hCT(9-32) via „lipid raft“-Endozytose.

Die vorübergehende Aufnahme von SAP und hCT(9-32)-br in Endosomen und ihre nachfolgende Freisetzung wurde durch Kollokalisations- und „Pulse-chase“-Studien der Peptide mit dem „early endosome antigen 1“ deutlich gemacht.

Unter dem Gesichtspunkt der metabolischen Stabilität der ZPPs betrachtet, sollten die Peptide in der Lage sein, Ihr Cargo zum Zielort zu transportieren, bevor sie gespalten werden. Daher untersuchen wir im 3. Kapitel dieser Arbeit den metabolischen Abbau der vier neu entwickelten ZPPs SAP, hCT(9-32)-br, [P $\alpha$ ] sowie [P $\beta$ ], auf den drei epithelialen Zellkulturen HeLa, Calu-3 und den konfluenten MDCK Zellen. Zusätzlich versuchen wir herauszufinden, ob bei den Peptiden eine Beziehung zwischen ihrer metabolischen Stabilität und ihrer zellulären Aufnahmeeffizienz besteht. Das Ausmaß an proteolytischer Aktivität variiert stark zwischen HeLa, MDCK und Calu-3 Zellen. Die jeweiligen metabolischen Abbaumuster der einzelnen ZPPs auf den Zellen sind dagegen sehr ähnlich. CF-SAP und CF-hCT(9-32)-br weisen die größte metabolische Stabilität der untersuchten ZPPs auf, weniger stabil ist [P $\beta$ ]-IAF und [P $\alpha$ ] stellt das am wenigsten stabile Peptid dar. Wir konnten weiterhin spezifische Abbaustellen für jedes der vier ZPPs identifizieren. Alle vier weisen in HeLa Zellen eine höhere Aufnahmeeffizienz auf als in MDCK und Calu-3 Zellen. Dies entspricht auch dem niedrigeren Differenzierungsstatus von HeLa-Zellkulturen. Für alle vier ZPPs lässt sich keine direkte Beziehung zwischen metabolischer Stabilität und Aufnahmeeffizienz ableiten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die metabolische Stabilität kein limitierender Faktor für effiziente zelluläre Aufnahme ist. Nichtsdestotrotz könnte die Aufnahme der einzelnen ZPPs durch strukturelle Modifizierung mit dem Ziel erhöhter metabolischer Stabilität weiter verbessert werden.

Das 4. Kapitel dieser Arbeit untersucht den Einfluss differenzierter Zellmodelle auf Aufnahmestudien und stellt entzündete Epithelien als mögliche Nischen für die Anwendung von ZPPs vor. SAP und hCT(9-32)-br werden effizient in proliferierende MDCK-Zellen aufgenommen. Hierbei ist unseren Ergebnissen zufolge sowohl Endozytose über „clathrin-coated pits“ als auch über „lipid rafts“ involviert. In ausdifferenzierten, konfluenten MDCK-Zellen beobachten wir jedoch eine stark verminderte Endozytoseaktivität, unabhängig vom jeweils getesteten, aufzunehmenden Stoff. Beim hier zugrunde liegende Mechanismus scheint es sich um die Herabregulierung der Endozytoseaktivität durch Rho-GTPasen zu handeln, welche bekanntermaßen bei Endozytose-Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Tatsächlich können wir eine Korrelation zwischen endozytotischer Aufnahme und aktiver Rho-A GTPase,

sowie eine Korrelation zwischen Zelldichte, zellulärer Differenzierung und endozytischer Herabregulierung auf der einen Seite und aktiver Rac-1 GTPase auf der anderen Seite beobachten. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, die den Mechanismus differenzierungsabhängiger Aufnahme von ZPPs in epitheliale Zellmodelle aufdeckt. Diese Erkenntnisse wurden für weitere Studien an MDCK-Modellen genutzt, welche mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  behandelt werden, um epitheliale Entzündung zu simulieren. Die Aufnahme der ZPPs in diese Entzündungsmodelle war in Abhängigkeit des Zytokingehalts erhöht, die maximale Steigerung lag bei bis zu 90%. Interessanterweise legen unsere Beobachtungen nahe, dass eine Zytokin-induzierte Umverteilung der "lipid-rafts" in konfluenten MDCK-Zellen an der beobachteten Erhöhung der ZPP-Aufnahme beteiligt ist.

Insgesamt beschreiben wir in dieser Dissertation die zellulären Aufnahmemechanismen, die intrazelluläre Wanderung und den metabolischen Abbau der zwei neu entwickelten ZPPs SAP and hCT(9-32)-br in epithelialen Zellkulturen. Im Vergleich zu anderen ZPPs, z.B. dem Tat-Peptid, weisen diese beiden Peptide den Vorteil vernachlässigbarer Toxizität und hoher metabolischer Stabilität auf. Zusätzlich ist die Erkenntnis ihrer Aufnahme über "lipid-raft"-Endozytose ein starkes Indiz für einen gemeinsamen Aufnahmemechanismus von ZPPs mittels Endozytose. Im Hinblick auf Beschränkungen bei der Aufnahme von ZPPs schlagen wir entzündete Epithelien als Perspektive für einen therapeutischen Anwendungsbereich vor.