

**PEPTYDY PENETRUJĄCE  
– RODZAJE I MECHANIZMY PRZENIKANIA  
PRZEZ BŁONY KOMÓRKOWE**

**CELL-PENETRATING PEPTIDES  
– TYPES AND MECHANISMS OF PENETRATION**

**Marcin T. Kawczyński<sup>1\*</sup>, Joanna Kreczko-Kurzawa<sup>2</sup>,  
Zbigniew Maćkiewicz<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej  
ul. Narutowicza 11/12, 80-223 Gdańsk  
\*e-mail: marcin.kawczynski@gmail.com*

<sup>2</sup> *Pracownia Chemii Makromolekuł Biologicznych,  
Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,  
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Rodziny peptydów penetrujących
  - 1.1. Oligokationowe cpp
  - 1.2. Amfipatyczne cpp
  - 1.3. Cpp bogate w prolinę
  - 1.4. Aktywowalne peptydy penetrujące (acpp)
  - 1.5. Hydrofobowe cpp
2. Mechanizmy penetracji błon biologicznych przez cpp
  - 2.1. Endocytoza
  - 2.2. Odwrócona micela
  - 2.3. Przenikanie adaptacyjne
  - 2.4. Mechanizm dywanowy
  - 2.5. Przenikanie przypominające elektroporację
  - 2.6. Wejście na granicy integralnych białek transbłonowych
3. Zastosowanie koniugatów substancji czynnych i peptydów penetrujących w roli proleków

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Marcin Kawczyński** urodził się w 1987 roku. W 2006 roku rozpoczął studia na kierunku Chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tytuł licencjata uzyskał w 2009 roku, a magistra w 2011. W tym samym roku rozpoczął studia doktoranckie w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej.

**Mgr Joanna Kreczko-Kurzawa** urodzona w 1984 roku, absolwentka pięcioletnich studiów magisterskich na kierunku Ochrona Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Dyplom magistra uzyskała w 2008 roku. Ponadto ukończyła Międzywydziałowe Studia Podyplomowe – Współczesne metody analityki z elementami diagnostyki molekularnej (dyplom uzyskany w 2010 roku).

**Prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz** urodził się w 1953 roku. W październiku 1973 rozpoczął studia na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, na kierunku Chemia. Od 1977 roku był pracownikiem Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii UG. Obecnie pełni funkcję kierownika Pracowni Makromolekuł Biologicznych w Katedrze Biotechnologii Molekularnej. Prof. dr hab. Zbigniew Maćkiewicz jest autorem i współautorem około 100 publikacji oraz ponad 200 komunikatów; był opiekunem 10 prac doktorskich.

---

**ABSTRACT**

Before discovery of the Tat peptide over twenty years ago, it was assumed that large peptides and proteins do not penetrate cell membranes. After discovery of Tat, Penetratin [1, 2] and several other peptides of natural origin, able to cross the cell membranes in an energy-independent manner, the structural determinants of their cell-penetrating potency were established, including polycationic character, amphipaticity and presence of proline-rich motifs [3, 4].

Currently known cell-penetrating peptides of natural or synthetic origin are composed of 5 to 40 amino acid residues and belong to one of the three families: oligocationic, amphipatic or proline-rich and penetrate the biological membranes by endocytosis or other ways of direct translocation. Most of these translocation mechanisms are not exclusive and may occur simultaneously, and their contribution may be different for each peptide depending on the conditions (e.g. CPP concentration, pH, etc.).

Most CPPs demonstrate little or no mammalian cell toxicity what makes them promising vectors for drug delivery. Such vectors might be useful for efficient internalization of compounds otherways poorly penetrating biological membranes. Novel CPP-effector conjugates may become effective anticancer or antimicrobial agents of a great potential for chemotherapy [3, 5].

In this short review we present a glimpse at the current state of knowledge concerning sub-families, types and mechanisms of action of most prominent members of CPP family.

**Keywords:** CPP, cell-penetrating peptides, penetratin, endocytosis, amphipaticity  
**Słowa kluczowe:** peptydy penetrujące, penetratyna, endocytoza, amfipatyczność

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

BIP	– peptydowy inhibitor Bax ( <i>ang. Bax inhibiting peptide</i> )
ACPP	– aktywowalne peptydy penetrujące ( <i>ang. activatable cell-penetrating peptides</i> )
CAMP	– kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe ( <i>ang. cationic antimicrobial peptides</i> )
CPP	– peptydy penetrujące błony komórki ( <i>ang. cell-penetrating peptides</i> )
FGF	– czynnik wzrostu fibroblastów ( <i>ang. fibroblasts growth factor</i> )
GFP	– białko zielonej fluorescencji ( <i>ang. green fluorescent protein</i> )
GST	– S-transferaza glutationu ( <i>ang. glutathione S-transferase</i> )
MTS	– sekwencje przenikania przez błony ( <i>ang. membrane translocating sequences</i> ), również CPP
NLS	– sekwencja lokalizacji jądrowej ( <i>ang. nuclear localisation sequence</i> )
PTD	– peptydowe domeny transdukcji ( <i>ang. peptide transduction domains</i> ), również CPP
TAR	– region transaktywujący ( <i>ang. trans-activation responsive element</i> )
TAT (lub Tat)	– transaktywator transkrypcji ( <i>ang. trans-activator of transcription</i> )

## WPROWADZENIE

Jeszcze nieco ponad dwadzieścia lat temu powszechnie sądzono, że cząsteczki peptydów i białek (oraz wielu innych związków polarnych) nie mają zdolności swobodnego przenikania przez błony biologiczne. Nieco później odkryto jednak grupę peptydów, które dzięki specyficznemu oddziaływaniu z błoną komórkową są w stanie wnikać do jej wnętrza oraz przedostać się na drugą stronę. Są to tzw. peptydy penetrujące (ang. CPP – *Cell Penetrating Peptides*; również PTD – ang. *peptide transduction domains*, MTS – ang. *membrane translocating sequences*, *Trojan peptides*). Niektóre z tych peptydów nie tylko potrafią przeniknąć do wnętrza komórki, ale również są w stanie zwiększyć przenikalność innych, nawet znacznie większych, związków.

Odkrycie peptydów penetrujących nastąpiło dość niedawno, bo pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku. Udowodniono wtedy, że jedno z białek wirusa HIV będące trans-aktywatorem transkrypcji (TAT) jest w stanie przeniknąć do wnętrza hodowanych komórek limfocytów, a zdolność ta jest wynikiem obecności w strukturze tego białka fragmentu oligopeptydowego o specyficznej sekwencji [1]. Niedługo później, podobne właściwości stwierdzono dla fragmentu białka homeotycznego występującego u muszki owocowej (*Drosophila*), który nazwano penetratyną [2, 6].

Te dwa odkrycia zapoczątkowały badania nad mechanizmami penetracji białek i peptydów przez błony i doprowadziły do odkrycia w białkach wirusów, komórek drobnoustrojów i organizmów wyższych kolejnych sekwencji stymulujących penetrację transbłonową [4]. Do chwili obecnej odkryto cały szereg takich sekwencji, jak również wykazano zdolności penetracyjne dla wielu peptydów, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i całkowicie syntetycznych sekwencji zaprojektowanych na podstawie analizy strukturalnej wcześniej odkrytych CPP [3].

Dość trudno podać jedną, spójną definicję peptydów penetrujących. Można powiedzieć, że CPP są krótkimi peptydami, liczącymi od 5 do 40 reszt aminokwasowych, posiadającymi zdolność wnikania do wnętrza komórki za pomocą różnych mechanizmów, w tym nie wymagających dostarczenia energii oraz endocytozy, bez angażowania specyficznych receptorów i stereospecyficznego rozpoznawania. Większość CPP nie posiada właściwości toksycznych, chociaż są znane przykłady CPP o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Przyłączenie CPP (kowalencyjnie lub niekowalencyjnie) do innych aktywnych biologicznie cząsteczek znacznie zwiększa zdolność przenikania przez błonę komórkową tych ostatnich [3, 5].

Istnieje wiele związków o budowie peptydowej, białkowej lub kwasów nukleinowych stanowiących potencjalne leki, które jednak nie są zbyt efektywne ze względu na ograniczoną przenikalność przez błony komórkowe [7]. Połączenie tych związków z nośnikiem w postaci CPP może stanowić szansę na zwiększenie ich penetracji błon komórkowych, a tym samym na zwiększenie efektywności. Tego typu połączenia są często w stanie nie tylko penetrować błony komórkowe, ale też przenikać do jądra komórkowego, a nawet pokonywać barierę krew-mózg [8].

## 1. RODZINY PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH

Podziału peptydów penetrujących można dokonać m.in. na podstawie: mechanizmu pokonywania błony komórkowej, sposobu tworzenia koniugatów, sekwencji i budowy peptydów lub ich pochodzenia. W przypadku tego ostatniego kryterium, wyróżnić można CPP pochodzenia naturalnego, CPP chimeryczne – stanowiące połączenie sekwencji dwóch naturalnych peptydów, z których jeden posiada właściwości penetrujące, zaś drugi modyfikuje to działanie oraz CPP syntetyczne, których sekwencja została opracowana na podstawie badań zależności struktura-aktywność.

Tabela 1. Najważniejsze rodziny peptydów penetrujących  
Table 1. The most important families of Cell-penetrating peptides

Klasyfikacja	Rodzina	Przykładowy CPP	Pochodzenie	Seqwencja	Przykład transportowanego związku	
Kationowe	Rodzina Tat	Tat (49-60)	Białko wirusa HIV-1	RKKRRQRR RPPQ [4]	$\beta$ -galaktozydaza [8]	
		Oligoarginina	Pochodna Tat	R <sub>n</sub> (gdzie n = 6–10) [4]	Cyklosporyna A [9]	
Amfipatyczne	Penetratyny	pAntp	Domena homeotyczna Antennapedia	RQIKIWFQN RRMKWKK [4]	Polo-box [10]	
		pIsl	Domena homeotyczna Isl-1	RVIRVWFQN KRCKDKK [4]	Biotyna [11]	
	Chimeryczne CPP	Transportan	Galanina i mastoparan	GWTLNSAGY LLGKINKAL AALAKKIL [4]	siRNA [12]	
		MPG	HIV-1 gp41 i NLS	GALFLGFLGA AGSTMGAWS QPKKKRKV [4]	siRNA [13]	
	Pochodne peptydów przeciwdrobnoustrojowych	Buforyna 2	Żołądek ropuchy	TRSSRAGLQW PVGRVHRL RK [4]	GFP [14]	
		SynB (1)	Protegryny	RGRRLSYSRR RFSTSTGR [4]	Doksorubicyna [15]	
		PAF26	Syntetyczny	RKKWFW [16]		
	Pochodne białka hCT	hCT (9-32)	Ludzka kalcytonina	LGTYTQDFNK FHTFPQTAIGV GAP [4]	GFP [17]	
	Bogate w prolinę	SAP		$\gamma$ -zeina	VRLPPVRL PP PVRLPPP [18]	Fluorofor [18]
	Peptydy hydrofobowe	Pochodne czynnika wzrostu fibroblastów	Seqwencja sygnałowa Kaposi FGF	Kaposi FGF	AAVALLPAVL LALLAP [19]	NF- $\kappa$ B [19]

Wydaje się, że najbardziej uzasadniony sposób podziału opiera się na wspólnych elementach strukturalnych. Pod tym względem wśród znanych CPP wyróżnić można trzy główne grupy: CPP oligokationowe, CPP amfipatyczne oraz CPP zawierające reszty proliny. W Tabeli 1 przedstawione zostały przykłady CPP należących tych grup, ich sekwencje aminokwasowe oraz przykłady ich zastosowania jako nośników substancji trudno penetrujących błony biologiczne.

### 1.1. OLIGOKATIONOWE CPP

Peptydy z tej rodziny charakteryzują się wysokim dodatnim ładunkiem wypadkowym cząsteczki wynikającym z dużej zawartości zasadowych reszt aminokwasowych lizyny i/lub argininy i niewielkiej ilości lub całkowitego braku reszt kwasowych. Szczególną rolę w przenikaniu przez błony wydają się pełnić grupy guanidynowe argininy. Wymiana reszt Arg na cytrulinę pozbawia CPP całkowicie zdolności do penetracji błony [20]. Arginina prawdopodobnie tworzy wielokrotne wiązania wodorowe z fosfolipidami na powierzchni komórki, co ma kluczowe znaczenie dla przenikania oligokationowych CPP [21].

#### 1.1.1. Białko Tat

Białko Tat (ang. *trans-activator of transcription*) zostało wyizolowane z wirusa HIV-1. Białko to przenika przez błonę komórkową limfocytów T, a następnie łączy się z mRNA na końcu 5' nici, gdzie znajduje się element TAR (ang. *trans-activation responsive element*). Połączenie białka z RNA następuje poprzez domenę Tat sekwencji RKKTTYRRR, zaś za odpowiedź jądra komórkowego (ang. *nuclear localisation signal*, NLS) odpowiada fragment peptydu o sekwencji GRKKR. Ten drugi fragment odpowiedzialny jest za przenikanie peptydu do jądra komórkowego [22].

Właściwości fragmentu białka Tat, jako peptydu penetrującego, zostały odkryte po raz pierwszy gdy zaobserwowano, że koniugat trzydziestosześcio-aminokwasowego fragmentu w/w białka (reszty 37–72) z  $\beta$ -galaktozydazą (177 kDa) był w stanie wnikać do wnętrza komórki zwierzęcej [23]. W późniejszych badaniach stwierdzono, że właściwości penetrujące wykazuje już krótszy fragment, Tat<sub>49-57</sub>, o sekwencji RKKRRQRRR.

Na podstawie badań analogów peptydu Tat z przyłączonymi sondami fluorescencyjnymi i prób z różnego typu inhibitorami procesów komórkowych (opisanych w dalszej części), jako główny mechanizm przenikania przez błony biologiczne zaproponowano endocytozę, która jest procesem zależnym od energii. Zdolność bezpośredniego przenikania przez błony jest jednak niezbędna, aby peptyd wraz z transportowanym związkiem mógł opuścić endosom [4].

Właściwości penetrujące, podobne do tych wykazywanych przez Tat<sub>49-57</sub>, stwierdzono dla syntetycznych oligopeptydów zbudowanych z reszt Arg lub Lys,

w tym oktaargininy i dekalizyny [23]. Ta pierwsza wykazuje nawet dwudziestokrotnie większą skuteczność niż sam peptyd Tat<sub>49-57</sub>.

## 1.2. AMFIPATYCZNE CPP

Peptydy należące do tej grupy charakteryzują się przede wszystkim obecnością dodatkowo naładowanych reszt aminokwasów (L-argininy i/lub L-lizyny) oraz reszt aminokwasów hydrofobowych (najczęściej L-tryptofanu i/lub L-feniloalaniny). Amfipatyczność tych peptydów można podzielić na pierwotną i wtórną. Pierwotna amfipatyczność wynika z wyraźnego podziału sekwencji peptydu na część hydrofobową i hydrofilową (np. tak jak w syntetycznym PAF26 o sekwencji RKKWFW). Wtórna amfipatyczność jest efektem powstawania peptydowych struktur drugorzędowych (np.  $\alpha$ -helikalnych), w których sprotonowane grupy z łańcuchów bocznych reszt aminokwasów zasadowych znajdują się po przeciwnej stronie struktury względem reszt hydrofobowych [18].

### 1.2.1. Penetratyny

Białka homeotyczne są jednym z czynników biorących udział w transkrypcji. Po raz pierwszy wykryto je u muszki owocowej (*Drosophila*), a następnie u innych zwierząt i roślin. Wiążą one DNA za pośrednictwem sekwencji 60 reszt aminokwasowych noszącej nazwę domeny homeotycznej, która zbudowana jest z trzech  $\alpha$ -helis, z czego trzecia rozpoznaje docelowe miejsce w helisie DNA.

Zdolność penetratyny (o sekwencji <sup>43</sup>RQIKIWF<sup>50</sup>QNR<sup>55</sup>KWKK) do przenikania błon komórkowych odkryta została w 1991 r. podczas badania roli domeny homeotycznej w rozwoju układu nerwowego [2]. Później powtórzono te obserwacje przy udziale innych domen homeotycznych i białek homeotycznych, co dało podstawy do stworzenia koncepcji peptydów penetrujących [6, 24].

Badając mutanty białek homeotycznych stwierdzono, że największy wpływ na ich przenikanie przez błony komórkowe ma sekwencja trzeciej helisy [25]. Zsyntezowany fragment składający się z szesnastu reszt aminokwasowych (43–58), który wykazuje zdolność penetracji błon biologicznych, jest ponadto w stanie wnikać do jądra komórki. Translokacja następowała we wszystkich typach badanych komórek ze 100% skutecznością, zarówno w temperaturze 4, jak i 37°C, co wskazuje na mechanizm niezależny od dostarczania energii [26]. Badania z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego wskazują na to, że w środowisku wodnym peptyd ten nie tworzy helisy; powstaje ona dopiero w środowisku hydrofobowym (np. wewnątrz błony komórkowej) [27].

Jako główny sposób transportu penetratyn przez błony komórkowe zaproponowano mechanizm odwróconej miceli (opisany w dalszej części). Oczywiście nie można wykluczyć innych mechanizmów, jednak wykonane badania wskazują na



znaczny udział wspomnianego powyżej procesu [6]. Pewien udział we wnikaniiu penetratyn do wnętrza komórki ma prawdopodobnie także endocytoza. Wskazuje na to zmniejszenie przenikalności po zastosowaniu inhibitorów metabolizmu oraz endocytozy. Ponadto wiązanie penetratyny na powierzchni komórki z glikozoaminoglikanami może inicjować endocytozę przyłączonego do tego peptydu „ładunku” o dużej masie [28].

### 1.2.2. Kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (CAMP)

Naturalne kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (CAMP) zawierają przeważnie od 13 do 50 reszt aminokwasowych. W ich sekwencjach wyróżnić można domeny o znacznym udziale reszt hydrofobowych oraz domeny złożone z reszt aminokwasów z kationową grupą w łańcuchu bocznym (lizyna oraz arginina). Syntetyczne pochodne CAMP mogą mieć znacznie krótszą sekwencję (poniżej 10 reszt aminokwasowych) [28].

Większość CAMP ma możliwość penetracji błony komórkowej mikroorganizmów doprowadzając do lizy komórek. Jednak część z nich jest w stanie przeniknąć w bardziej subtelny sposób poprzez błonę, nie niszcząc komórki. Te właśnie zaliczają się do peptydów penetrujących [29].

Związek nazwany skrótowo PAF26 jest heksapeptydem o sekwencji RKKWFW i o stwierdzonym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Mechanizm tego działania nie został jeszcze do końca poznany [30]. W toku badań stwierdzono, że PAF26 jest w stanie pokonywać błony komórkowe [28].

Widoczny jest podział tego peptydu na część o charakterze hydrofilowym (arginina i dwie reszty lizyny) i hydrofobowym (fenyloalanina i dwie reszty tryptofanu). Ma to duży związek z przenikaniem błon. Okazuje się, że prawdopodobnie mechanizm przenikania jest zależny od stężenia peptydu. W niskich stężeniach transport zależny jest od energii, zaś przy wyższych – przejście przez błonę następuje niezależnie od energii. Jako najbardziej prawdopodobny sposób przenikania błon dla CAMP postulowany jest „mechanizm dywanowy”. Prawdopodobnie właściwości penetrujące w sposób niezależny od energii wykazuje jedynie wersja PAF26, w której *N*-końcowa grupa *α*-aminowa jest acetylowana, a *C*-końcowa grupa *α*-karboksylowa występuje w formie amidowej. Wolny heksapeptyd wnika efektywnie do komórek, jednakże głównie za pośrednictwem białek transportowych, nazywanych permeazami oligopeptydowymi [Schiellmann M., Kawczyński M. i in., dane niepublikowane].

### 1.2.3. Transportan – CPP chimeryczny

Transportan jest syntetycznym peptydem zbudowanym z 27 reszt aminokwasowych. Podzielić go można na dwie części: *N*-końcowy, 12-peptydowy fragment

galaniny (neuropeptydu) oraz mastoparan (peptyd pochodzący z jadu os, który ma zdolność oddziaływania z błoną komórkową), połączone resztą lizyny [31]. Jego sekwencja przedstawia się następująco: GWTLNSAGYLLG<sup>13</sup>KINLKALAALAK-KIL.

Podobnie jak w przypadku niektórych peptydów penetrujących, widać tu wyraźny podział na część hydrofilową, zawierającą reszty lizyny oraz hydrofobową, w skład której wchodzi między innymi tryptofan.

Badania przenikania transportanu z zastosowaniem inhibitorów endocytozy dowodzą, że nie bierze ona udziału podczas translokacji tego peptydu przez błonę, a rzeczywisty mechanizm translokacji jest niezależny od energii metabolicznej. Wykazano też, że przenikalność nie zależy od rodzaju komórki, a transportan jest w stanie przeniknąć nie tylko do cytoplazmy, ale także do jądra komórkowego. W przypadku transportanu najprawdopodobniej największy udział w przenikaniu błon ma mechanizm dywanowy [31].

### 1.3. CPP BOGATE W PROLINĘ

Część peptydów z tej grupy można zaklasyfikować jako peptydy amfipatyczne wtórne ze względu na tworzenie struktury poliproliny II połączonej z hydrofilowymi resztami aminokwasów. Powstająca w ten sposób helisa zawiera 3.0 reszty aminokwasowe na skręt [18]. Przykładem może być tu pochodzący z białka  $\gamma$ -zeiny peptyd SAP o sekwencji: VRLPPPVRLPPPVRLPPP. 50% sekwencji tego peptydu stanowi prolina, dzięki czemu tworzy się wspomniana wcześniej helisa. W pozycjach 2, 8, 14 znajdują się zasadowe reszty argininy, które tworzą hydrofilową stronę peptydu, zaś walina w pozycjach 1, 7 i 13 tworzy stronę hydrofobową (Rys. 1) [18].



Val - Arg - Leu - Pro - Pro - Pro - Val - Arg - Leu - Pro - Pro - Pro - Val - Arg - Leu - Pro - Pro - Pro

Rysunek 1. Trójwymiarowa struktura helisy peptydu SAP bogatego w prolinę. Hydrofilowe reszty Arg skierowane są w jednym kierunku, zaś hydrofobowe reszty Val i Leu w przeciwnym. Na podstawie [32]  
 Figure 1. Helical structure of proline-rich SAP. Hydrophilic arginine residues are clustered on the one side and hydrophobic residues (Valine and Leucine) on another one. Based on [32]

Zbadano również peptydy zbudowane na bazie struktury polihydroksyproliny. Zmodyfikowano reszty hydroksyproliny w taki sposób, że do grupy hydroksylowej przyłączano podstawniki hydrofobowe lub kationowe. Następnie łączono je na przemian: jedna hydroksyprolina z hydrofobowym podstawnikiem i dwie następane

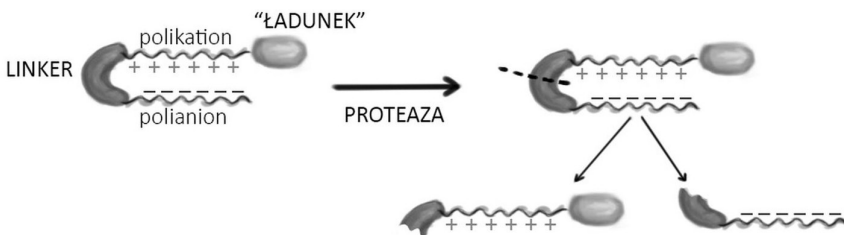
z hydrofilowym. Otrzymano w ten sposób helisę zawierającą 3.0 reszty na skręt (analogicznie jak struktura poliproliny II) o właściwościach amfipatycznych. Otrzymany peptyd okazał się mieć zdolność przenikania błon komórkowych [33].

Peptyd SAP oraz jego analogi, podobnie jak  $\gamma$ -zeina, mają tendencję do agregacji w długie fibryle. Tworzą się one z opisanych powyżej struktur układając się hydrofobową stroną do wnętrza, a hydrofilową na zewnątrz. Powstałe w ten sposób cylindryczne micle, łączą się dalej tworząc fibryle [32]. Może mieć to związek z przenikaniem peptydu do wnętrza komórek, gdyż dodatnio naładowane łańcuchy boczne aminokwasów będą oddziaływały z ujemnymi ładunkami fosfolipidów.

Własności penetrujące są sugerowane także dla mniejszych oligopeptydów takich, jak np. VRLPPP, jednakże nie zostało to jednoznacznie potwierdzone.

#### 1.4. AKTYWOWALNE PEPTYDY PENETRUJĄCE (ACPP)

W 2004 roku przeprowadzono badania z wykorzystaniem syntetycznych peptydów, które nazwano aktywowalnymi peptydami penetrującymi (ACPP). W ich budowie można znaleźć fragmenty sekwencji poznanych i opisanych CPP, które zostały zmodyfikowane poprzez dodanie kolejnych elementów. ACPP składają się więc z trzech części; pierwszą jest właściwy peptyd penetrujący (analog białka Tat, który zawiera znaczną ilość kationowych reszt aminokwasowych argininy i lizyny), druga część to łącznik (linker) podatny na działanie enzymu proteolitycznego, zaś trzecia część to inhibitor transdukcji będący peptydowym łańcuchem zbudowanym z reszt aminokwasowych posiadających ujemnie naładowane grupy boczne (najczęściej kwasu glutaminowego). Dzięki takiej budowie, oddziaływanie dodatnio naładowanych łańcuchów bocznych z fosfolipidami błony komórkowej jest znacznie utrudnione i peptyd nie wykazuje przenikalności do momentu, gdy linker nie zostanie przecięty przez odpowiednią proteazę. Wtedy peptyd penetrujący zaczyna działać normalnie (Rys. 2) [34].



Rysunek 2. Sposób działania ACPP: Część polianionowa oddziałuje z częścią polikationową; w wyniku działania proteazy dochodzi do rozerwania linkera i odblokowania części kationowej, a tym samym umożliwienia przenikania CPP

Figure 2. Mechanism of action of activable CPPs. A polycationic part of the molecule interacts with a polyanionic one. Upon the action of proteases, the linker is cleaved, the polycationic fragment becomes unblocked what facilitates CPP penetration

Jednym z wykorzystywanych linkerów jest peptydowa sekwencja PLGLAG, która jest substratem dla metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Linker ten został zaprojektowany do przenoszenia przez CPP leku przeciwnowotworowego, ponieważ duża produkcja MMP jest związana z rozwojem komórek nowotworowych. Dzięki temu lek przenika do wnętrza komórek głównie w miejscach powstawania guza [35]. Z powodzeniem prowadzone są również badania nad zastosowaniem ACPP osadzonych na powierzchni nanocząstek będących lekami [36].

### 1.5. HYDROFOBOWE CPP

CPP należące do tej rodziny są stosunkowo nieliczne w porównaniu do kationowych czy amfipatycznych CPP. Można je podzielić na takie, które zbudowane są wyłącznie z reszt hydrofobowych oraz takie, które zawierają nieliczne, zjonizowane reszty aminokwasowe, jednak ich sumaryczny ładunek jest niewielki [37].

Jednym z pierwszych opisanych peptydów tej rodziny był hydrofobowy fragment domeny sygnałowej czynnika wzrostu fibroblastów Kaposiego (K-FGF) o sekwencji AAVALLPAVLLALLA. Peptyd ten wykazywał dobrą przenikalność do komórek, podobnie jak jego koniugat z większymi fragmentami peptydowymi (sekwencją lokalizacji jądrowej – NLS) [19].

Dalsze badania czynnika wzrostu fibroblastów doprowadziły do opisanego kolejnych peptydów takich, jak np. fragment FGF12 o sekwencji PIEVCMYREP (określony mianem CPP-C). Białko, z którego pochodzi, nie oddziałuje na żadne receptory wzrostu fibroblastów, jednak ma zdolność przenikania do wnętrza komórki. Również koniugaty tych sekwencji z innymi peptydami są zdolne do penetracji błony komórkowej, a nawet wnikania do jądra komórkowego [40].

Innymi ciekawymi peptydami zaliczanymi do tej rodziny, są pentapeptydowe fragmenty białka Ku70, wybrane z tzw. domeny inhibitorowej Bax (Bax jest induktorem programowanej śmierci komórki, zaś jedną z ról białka Ku70 jest jego inhibicja). Peptydy te, o przykładowych sekwencjach: PMLKE, VPALR, IPALK, VPTLK, w literaturze występują pod nazwą BIP. Pomimo niewielkiego rozmiaru, peptydy BIP są w stanie transportować białko GFP przez błonę komórkową [38].

Sposób pokonywania błony komórkowej przez te peptydy nie został jeszcze jednoznacznie ustalony. Wiadomo, że CPP-C przenika poprzez endocytozę, a następnie ucieka z endosomu [40]. W początkowych badaniach peptydu K-FGF ustalono, że jego przenikanie do komórki jest niezależne od ATP [19]. Grupa syntetycznych, hydrofobowych CPP prawdopodobnie jest w stanie przenikać przez błonę bezpośrednio. Są to peptydy o sekwencjach otrzymanych z biblioteki stworzonej na bazie obliczeń statystycznych bazujących na sekwencjach znanych już CPP. Były one w stanie przenikać przez sztuczną błonę fosfolipidową, więc endocytoza nie wchodziła tu w grę. Wykazały również taką zdolność w badaniach na żywych komórkach [39].

## 2. MECHANIZMY PENETRACJI BŁON BIOLOGICZNYCH PRZEZ CPP

Na podstawie dotychczasowych badań opracowano kilka możliwych mechanizmów transportu peptydów przez błony komórkowe. Większość z nich nie wyklucza się wzajemnie i prawdopodobnie występuje równolegle, a ich udział może być różny dla danego peptydu zależnie od warunków (np. stężenia CPP, pH, temperatury, itp.).

Mechanizmy penetracji CPP przez błony można podzielić na różnego rodzaju endocytozy (wykorzystujące energię metaboliczną, czyli zgromadzoną w komórce w postaci ATP) oraz bezpośredni transport przez błonę komórkową. Ten drugi rodzaj transportu jest niezależny od energii i temperatury. W jego trakcie dochodzi do lokalnej destabilizacji błony komórkowej, w trakcie której peptydy przedostają się na jej drugą stronę. W początkowych badaniach CPP postulowano właśnie ten mechanizm przenikalności, później go odrzucono, by ostatecznie jednak potwierdzić taki przebieg poprzez doświadczenia z zastosowaniem inhibitorów endocytozy, prowadzone w niskich temperaturach [41, 42].

Ustalono kilka cech wspólnych, charakterystycznych dla większości CPP, które mają duże znaczenie dla transportu poprzez błony komórkowe. Jedną z nich jest obecność dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych L-argininy i L-lizyny (cecha ta nie dotyczy hydrofobowych CPP). Ich rolą jest oddziaływanie z ujemnie naładowanymi fosfolipidami i proteoglikanami występującymi na powierzchni komórki. Ponadto stwierdzono, że arginina ma większe znaczenie dla przenikalności niż reszty lizyny [43]. Może mieć to związek z tworzeniem się wiązań wodorowych pomiędzy grupami guanidynowymi łańcucha bocznego argininy, a fosforanowymi, sulfonowymi lub karboksylowymi składnikami błony [21].

Obecność reszt aminokwasów o charakterze hydrofobowym w sekwencji ma istotny wpływ na zdolność przenikania, jednakże zbyt duża hydrofobowość może prowadzić do zmniejszenia przenikania wynikającego z zatrzymywania takiego peptydu wewnątrz błony komórkowej [44]. Szczególną rolę odgrywają tutaj reszty aminokwasów aromatycznych, w tym L-tryptofanu, nie tylko ze względu na hydrofobowość, ale również zwiększoną gęstość elektronową wynikającą z obecności zdelokalizowanych elektronów  $\pi$ . Tryptofan ma także duży udział w destabilizacji błony komórkowej [45]. Ma on możliwość oddziaływania z białkami błonowymi oraz glikozaminoglikanami, co powoduje przenikanie CPP na drugą stronę błony komórkowej [46].

Jak wykazały badania, konfiguracja absolutna reszt aminokwasowych w CPP nie ma większego wpływu na przenikanie przez błony, gdyż mechanizmy transdukcji nie angażują żadnych specyficznych receptorów. Nawet jeśli analog tworzy drugorzędową strukturę (np. helisę), a zbudowany jest z reszt D-aminokwasów, struktura ta stanowi odbicie lustrzane pierwotnej struktury i oddziałuje z błoną w analogiczny sposób jak „oryginał”. Ponadto analogi zbudowane z reszt D-aminokwasów są dłużej akumulowane w komórkach, co wynika z ich większej odporności na działanie enzymów tnących wiązania peptydowe [18, 27, 28].

## 2.1. ENDOCYTOZA

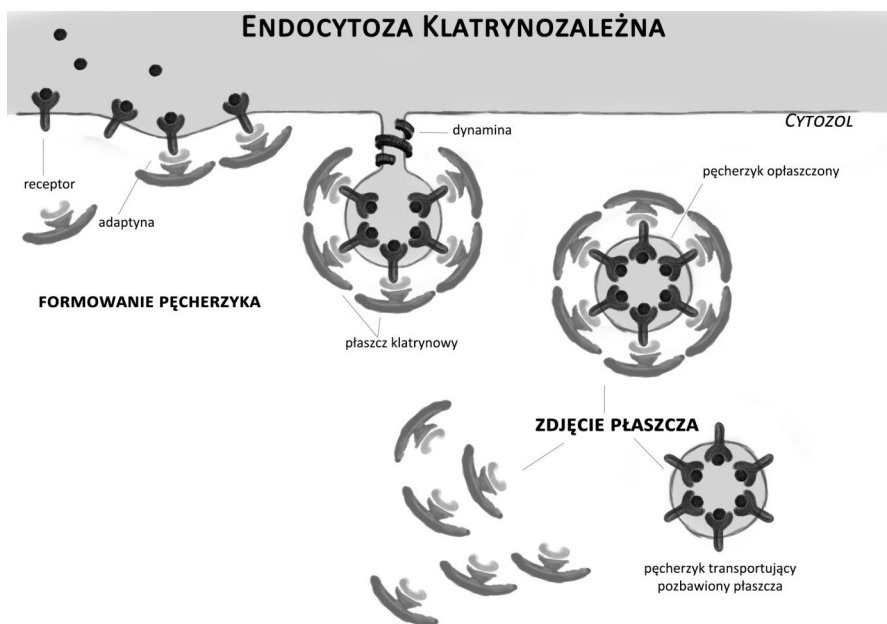
Endocytoza jest procesem występującym praktycznie w każdej komórce, zależnym od energii i przez komórkę regulowanym. Ma na celu dostarczenie komórce niezbędnych substancji ze środowiska. Jako mechanizm translokacji peptydów penetrujących przez błonę dzieli się na dwa etapy: wniknięcie do komórki poprzez endocytozę i ucieczkę z endosomu. Endocytoza w różnych formach towarzyszy przenikaniu większości peptydów, jednak w przypadku pochodnych peptydu Tat ma główny udział w transporcie.

Badania nad mechanizmem transdukcji zaczęły się od obserwacji przeniesienia dużego enzymu przez krótki fragment białka Tat do wnętrza komórki ssaka. Udowodniono, że białko Tat posiada dwie domeny: jedna z nich – domena podstawowa – inicjuje wniknięcie do wnętrza jądra komórkowego i może odpowiadać za pokonywanie błon biologicznych, a drugą jest przylegająca  $\alpha$ -helisa poprzez którą białko oddziałuje z RNA [47]. Podobna konfiguracja występowała w przypadku penetratyn – co wtedy było uznawane za istotne w procesie przenoszenia do wnętrza komórki [26].

Grupę analogów peptydu Tat z delecją w domenie podstawowej lub w  $\alpha$ -helisie przebadano pod względem przenikania przez błony komórkowe przy użyciu znakowania fluorescencyjnego. Na podstawie tych doświadczeń jednoznacznie wykazano, że  $\alpha$ -helisa nie ma wpływu na transport przez błonę komórkową. Jako prototyp peptydu penetrującego Tat uznano sekwencję GRKKRRQRRR, która zawiera wspomniany już fragment odpowiedzialny za oddziaływanie białka Tat z RNA oraz motyw NLS. Ponadto usunięcie z peptydu  $\alpha$ -helisy zmniejszyło jego cytotoksyczność [48]. Skan alaninowy sekwencji transportującej pokazał, że wymiana któregośkolwiek aminokwasu powoduje znaczne zmniejszenie zdolności przenikania błon [49, 50].

Początkowo postulowany mechanizm niezależny od energii, został zakwestionowany [51]. Badania przenikalności przy użyciu znaczników fluorescencyjnych wskazywały na akumulację wewnątrz komórek. Jednak peptydy Tat chętnie łączą się z ujemnie naładowanymi cząstkami, w tym nie tylko z peptydoglikanami i fosfolipidami występującymi na powierzchni błony komórkowej, ale także z powierzchniami szklanymi i plastikowymi. Przemywanie, stosowane w tych badaniach, nie wystarczyło do odmycia z powierzchni naczyń związanego z nimi znakowanego peptydu co w konsekwencji prowadziło do zafałszowania wyników [52]. Zatem endocytoza jako mechanizm przenikania peptydu Tat do wnętrza komórki nie mogła być odrzucona. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że peptyd Tat znacznie chętniej łączy się z glikozaminoglikanami na powierzchni komórki niż z ujemnie naładowanymi fosfolipidami tworzącymi ścianę komórkową [53–55]. Potwierdzono to przeprowadzając testy na mutantach z zaburzeniem w syntezie glikozaminoglikanów – w tym wypadku peptyd Tat nie przenosił „ładunku” do wnętrza komórki [56].

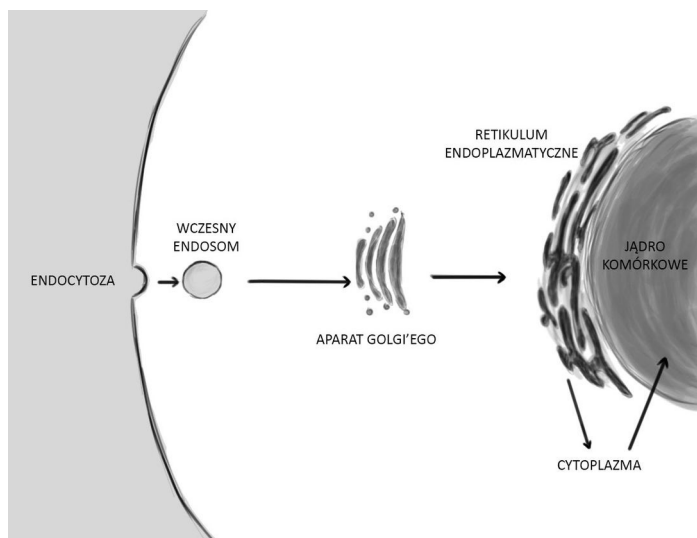
Badania pełnego peptydu Tat oraz koniugatów peptydu Tat z fluorochromami z zastosowaniem inhibitorów endocytozy klatrynozależnej (w których zmieniono metodologię, aby uniknąć zanieczyszczeń w postaci peptydu związanego z powierzchnią naczynia) [57], pokazały znaczny spadek wnikania do wnętrza komórki (Rys. 3). Z drugiej strony, dodatek inhibitorów endocytozy zależnej od tratw lipidowych nie wpłynął znacząco na przenikanie peptydu Tat [57–59]. Opublikowano też doświadczenia przeprowadzone na koniugatach peptydu Tat z rekombinazą Cre oraz koniugatu GST-Tat-GFP, które sugerują makropinocytozę lub endocytozę klatrynozależną [60–62]. Może to wskazywać na różnorodność mechanizmów, które odpowiadają za przenikanie peptydu Tat oraz jego analogów i koniugatów.



Rysunek 3. Mechanizm endocytozy klatrynozależnej  
Figure 3. Clathrin-dependent endocytosis mechanism

Badania potwierdzają, że peptyd Tat jest w stanie regulować własną endocytozę oddziałując na aktynę w cytoszkielecie, [63].

Niezależnie od tego jaki rodzaj endocytozy czy pinocytozy towarzyszy wnikaniu peptydu Tat do wnętrza komórki, problemem pozostaje ucieczka związku z endosomu, by uniknąć rozkładu „ładunku” transportowanego przez peptyd. Mechanizm tej ucieczki nie został jeszcze poznany. Jedną z propozycji jest przedostawanie się peptydu do innych organelli komórkowych, a na końcu do cytoplazmy. Odbывается to na zasadzie wstecznego transportu wczesnego endosomu do aparatu Golgiego; następnie do retikulum endoplazmatycznego i stamtąd do cytoplazmy [4] (Rys. 4).



Rysunek 4. Proponowana droga „ucieczki” CPP z pęcherzyka endosomalnego w oparciu o [4]  
 Figure 4. Postulated way of escape from endosomal vesicles. According to [4]

## 2.2. ODWRÓCONA MICELA

Mechanizm odwróconej miceli jako główny sposób przenikania błon został zaproponowany dla penetratyny. Aby stwierdzić, co wpływa na przenikanie penetratyny przez błony biologiczne i na jakiej drodze się to odbywa, zsyntezowano grupę analogów tego peptydu.

Analog o sekwencji zbudowanej z D-aminokwasów oraz analog o odwróconej sekwencji (43-58) wykazały taką samą przenikalność jak penetratyna w temperaturze 4°C, jak i 37°C. Wyklucza to udział chiralnych receptorów błonowych w procesie przenikania. Pod uwagę brano była możliwość wnikania poprzez pinocytozę, gdyż nie jest ona zatrzymywana w temperaturze 4°C, nie nasycy się, a receptory błonowe nie biorą w niej udziału, jednak badania akumulacji tych peptydów nie wykazały oznak pinocytozy, zaś peptydy znajdowały się zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze. To wyklucza pinocytozę jako sposób przenikania błon. D-aminokwasowa pochodna wykazała większą akumulację, co jest dość typowe dla tego rodzaju peptydów, gdyż peptydy zbudowane z reszt D-aminokwasowych trudniej poddają się proteolizie [27, 64].

W celu oceny wpływu konformacji penetratyny na jej działanie, przeprowadzono eksperyment, który polegał na przyłączeniu L-cysteiny na N- i C-końcu penetratyny, a następnie utworzeniu wiązania disulfidowego, aby otrzymać peptyd o strukturze cyklicznej. Okazało się, że peptyd w formie liniowej przenika przez błonę komórkową, zaś forma cykliczna nie. Wskazuje to na istotny wpływ struktury przestrzennej na przenikanie związku przez błonę komórkową [64].

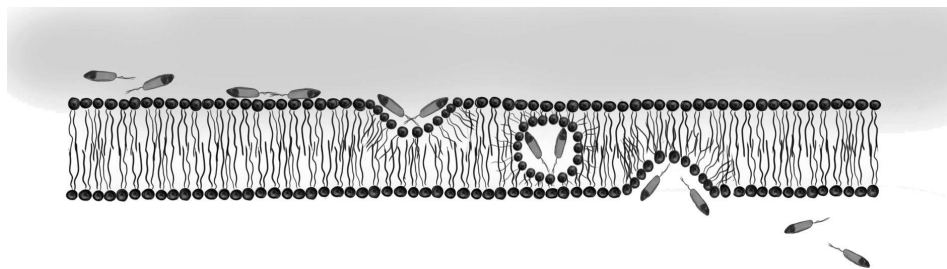


Innym doświadczeniem było otrzymanie dwóch analogów: jednego, w którym 50 reszta aminokwasowa (glutamina) została wymieniona na L-prolinę i drugiego, w którym na L-prolinę wymieniono reszty 45, 50 i 55 (odpowiednio izoleucyna, glutamina, lizyna). Prolina utrudnia organizowanie się peptydu w helisę (jest tzw. „łamaczem  $\alpha$ -helisy”). Okazało się, że takie analogi również przenikają przez błonę, jednak badanie mikroskopem elektronowym pokazało, że analogi nie miały dostępu do jądra komórkowego [65].

W celu oceny wpływu amfifilowości na przenikanie, zsyntezowano analog penetratyny, w którym wymieniono reszty tryptofanu 48 i 56 na fenyloalaninę. Okazało się, że otrzymany analog nie przenika przez błony. Prowadzi to do wniosku, że sama amfifilowość nie jest wystarczająca, aby peptyd mógł przeniknąć przez błonę [26]. Wskazuje to również na istotną rolę reszt tryptofanu w procesie penetracji błony. Uściśliły to wyniki badań, w których analog domeny homeotypycznej z delecją Trp56 przenikał przez błonę komórkową [66].

Zaobserwowano, że długość sekwencji ma wpływ na przenikanie peptydu. Analogi penetratyny skracane od C-końca bardzo szybko traciły możliwość przenikania przez błony, natomiast w przypadku usuwania N-końcowych reszt aminokwasowych spadek przenikalności był mniejszy. Heptapeptyd (52-58) wykazuje przenikalność z wydajnością 60% względem oryginalnej penetratyny [64].

Skan alaninowy wskazuje przede wszystkim na istotną rolę reszt L-lizyny i L-argininy. Wymiana reszty tryptofanu 48 na L-alaninę sprawiła, że peptyd stracił możliwość przenikania przez błony [25, 67].



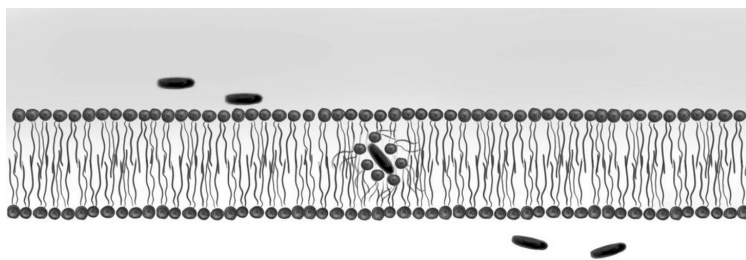
Rysunek 5. Mechanizm wnikania CPP do wnętrza komórki na zasadzie odwróconej miceli

Figure 5. Reverse micelle mechanism of CPP transduction

Na podstawie powyższych informacji zaproponowano mechanizm odwróconej miceli. Na początku CPP jest stabilizowany na powierzchni komórki w wyniku oddziaływań elektrostatycznych reszt obdarzonych ładunkiem dodatnim (Lys i Arg) z ujemnie naładowanymi „głowami” fosfolipidów. W tym momencie reszta Trp48 inicjuje powstanie odwróconej miceli wokół CPP, która przenosi peptyd na drugą stronę błony komórkowej. Możliwy jest też wariant, w którym powstanie odwróconej miceli zaburza strukturę błony, co pozwala na przeniknięcie peptydu.

### 2.3. PRZENIKANIE ADAPTACYJNE

Mechanizm przenikania adaptacyjnego występuje m.in. w transporcie poliargininy. Peptyd ten oddziałuje swoimi dodatnio naładowanymi grupami guanidynowymi z fosfolipidami i jednocześnie tworzy z nimi wiązania wodorowe. W ten sposób dodatni ładunek peptydu jest maskowany, co znacznie obniża jego polarność. Peptyd może zanurzyć się w błonie komórkowej i w ten sposób przedostaje się na jej drugą stronę. Mechanizm ten pokazuje, jak istotny wpływ dla przenikania peptydów nośnikowych ma potencjał elektrostatyczny błony komórkowej oraz obecność dodatnio naładowanych grup guanidynowych reszt argininy [68].



Rysunek 6. Schemat mechanizmu przenikania adaptacyjnego  
Figure 6. Adaptive translocation mechanism

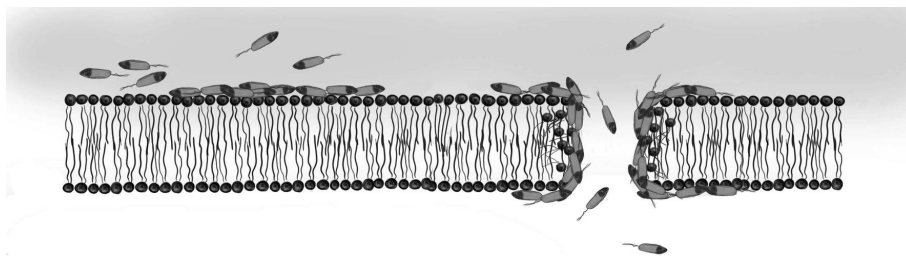
### 2.4. MECHANIZM DYWANOWY

Mechanizm dywanowy został zaproponowany m.in. dla peptydu PAF26, w którego strukturze wyraźnie widoczny jest podział na dwie części: jedną obdarzoną ładunkiem i drugą o charakterze hydrofobowym. Można zauważyć pewne podobieństwo PAF26 do penetratyny, która zawiera znaczną ilość naładowanych reszt aminokwasowych w jednej części oraz resztę tryptofanu, która ma istotne znaczenie dla właściwości tego peptydu [25, 67].

PAF26 jest zbyt krótkim peptydem aby tworzyć strukturę drugorzędową. Potwierdziły to badania z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego [69].

Postanowiono porównać działanie bakteriobójcze PAF26 z innym peptydem przeciwdrobnoustrojowym: KR20 (składającym się z dwudziestu reszt aminokwasowych – fragmentem większego peptydu K126 pochodzącego z katelicydyny LL37) [28]. Jednak interesujące wyniki przyniósł dopiero kolejny eksperyment, w którym przetestowano aktywność koniugatu obu powyższych związków. Co ciekawe, koniugat był co najmniej równie skuteczny jak każdy jego składnik z osobna, a w większości przypadków przewyższał je aktywnością. Naukowcy chcieli ustalić, czy wydłużenie sekwencji KR20 o sześć reszt aminokwasowych wpływa na skuteczność tego peptydu. Zsyntezowali więc peptyd, który jest analogiem KR20 – przedłużonym o sześć kolejnych reszt aminokwasowych pochodzących z peptydu K126. Nie wykazywał on jednak skuteczności większej niż KR20. Kolejną próbą wyjaśnienia

tego zjawiska, była synteza peptydu P20 o sekwencji: RKRPFW, który jest analogiem PAF26, nie posiadającym jednak właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Jego koniugat z KR20 również wykazywał aktywność większą niż sam peptyd KR20, choć mniejszą niż koniugat PAF26-KR20. W oparciu o te wyniki można stwierdzić, że zarówno PAF26, jak i jego analog P20, u którego nie obserwowano działania przeciwdrobnoustrojowego, muszą ułatwiać wnikanie KR20 do wnętrza komórki [70].



Rysunek 7. Tworzenie „dywanu” i przenikanie CAMP przez błonę komórkową; w oparciu o lit. [73]  
Figure 7. Carpet-like mechanism of CAMP internalisation. Based on [73]

Mechanizm przenikania PAF26 nie jest jeszcze do końca ustalony i prawdopodobnie jest zależny od stężenia. Przy niskich stężeniach peptydu następuje endocytotza i przeniesienie peptydu z endosomu do wakuoli, skąd następnie przedostaje się on do cytoplazmy. Przy wyższych stężeniach peptyd przenika bezpośrednio przez błonę komórkową do wnętrza komórki [71]. Przy tych stężeniach peptyd prawdopodobnie oddziałuje dodatnio naładowanym fragmentem z ujemnie naładowanymi „głowami” fosfolipidów błonowych. Na powierzchni błony komórkowej tworzy się „dywan”, który po osiągnięciu odpowiedniego stężenia destabilizuje miejscowo błonę, w której tworzą się pory, przez które peptyd jest w stanie przeniknąć do wnętrza komórki (Rys. 7) [72].

Prawdopodobnym jest również mechanizm, w którym peptyd wchłaniany jest do komórki i trafia do wakuoli, a stamtąd dopiero do cytoplazmy. Taki mechanizm sugerują badania, w których wykorzystano dwa analogi: AAAWFW oraz RKKAAA. Jeden zawiera część hydrofobową (WFW), podczas gdy drugi zawiera część kationową (RKK) peptydu PAF26. Za pomocą znakowania fluorescencyjnego pierwszy z nich został wykryty w wakuolach, ale nie w cytoplazmie. Drugi zaś akumulował się na otoczce komórki, w ogóle nie przenikając do wnętrza [74].

## 2.5. PRZENIKANIE PRZYPOMINAJĄCE ELEKTROPORACJĘ

Część badaczy sugeruje udział mechanizmu przypominającego elektroporację w przenikaniu penetratyn i wiąże go z rozkładem ładunków na zewnątrz i wewnątrz komórki. Powyżej pewnego stężenia peptydu (zawierającego dodatnio naładowane łańcuchy boczne) asymetryczne rozłożenie ładunku po obu stronach błony komór-

kowej może powodować destabilizację struktury fosfolipidowej w błonie komórkowej, co znacząco ułatwia peptydom jej pokonanie [75].

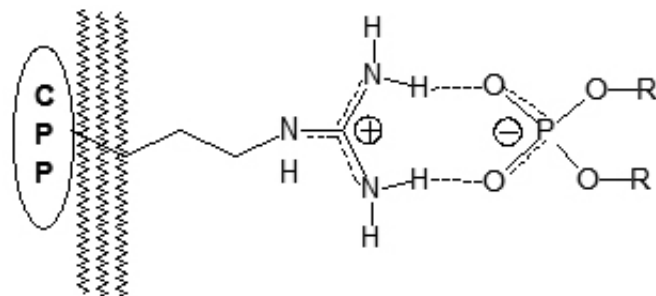
## 2.6. WEJŚCIE NA GRANICY INTEGRALNYCH BIAŁEK TRANSBŁONOWYCH

Obszary błony komórkowej znajdujące się pomiędzy różnymi białkami transbłonowymi mogą zawierać defekty, które mogą ułatwiać przenikanie peptydom penetrującym, bądź działać jako miejsca „zarodkowania” tworzących się porów. Takie obszary mogą powstawać poprzez oddziaływanie peptydów z ujemnie naładowanymi fosfolipidami, co może prowadzić do lokalnej reorganizacji oraz destabilizacji błony komórkowej [76].

## 3. ZASTOSOWANIE KONIUAGATÓW SUBSTANCJI CZYNNYCH I PEPTYDÓW PENETRUJĄCYCH W ROLI PROLEKÓW

Peptydy penetrujące mogą zostać użyte jako wektory ułatwiające transport różnych klas związków (określanych jako „ładunek” lub cargo) przez błonę komórkową. Transportowanymi związkami mogą być m.in.: białka [8], oligopeptydy [77], oligonukleotydy [78], siRNA [27, 28], kwasy peptydonukleinowe [79] czy nanocząstki [34].

Przyłączenie „ładunku” do CPP lub jego pochodnej może nastąpić poprzez wiązania kowalencyjne lub jonowe. Najprostszym sposobem jest utworzenie wiązania peptydowego, amidowego lub estrowego pomiędzy CPP a związkiem, którego przenikalność ma zostać zwiększona. Odłączenie „ładunku” następuje poprzez enzymatyczne cięcie tych wiązań wewnątrz komórki. Drugim sposobem jest wprowadzenie reszty L-cysteiny na N-koniec sekwencji transportowanej. Grupa tiolowa przyłączana jest wiązaniem disulfidowym do analogicznej grupy L-cysteiny w CPP. Uwolnienie „ładunku” następuje w wyniku rozcięcia wiązania disulfidowego w redukującym środowisku cytoplazmy [80].



Rysunek 8. Schemat wiązań wodorowych pomiędzy grupą guanidynową a grupą fosforanową według lit. [81]  
Figure 8. Hydrogen bonds between the guanidine moiety of CPP and the phosphate group of a “cargo”.  
Based on [81]

Interesującą możliwością wydaje się tworzenie kompleksów jonowych pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami guanidynowymi arginin w CPP typu okta-argininy, a ugrupowaniami fosforanowymi lub karboksylowymi ładunku (Rys. 8). Połączenia takie utworzone dla oktargininy i inhibitora enzymatycznego o strukturze aminokwasowej – fosfidomycyny, były efektywnie transportowane do komórek bakteryjnych [82].

Metoda ta znalazła zastosowanie DNA do komórek eukariotycznych, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [83]. Daje to możliwość wprowadzania genów do komórki leczeniu terapią genową. Zastosowanie koniugatów z CPP może być w tym przypadku pewną alternatywą dla wektorów wirusowych, których stosowanie może być ograniczone poprzez immunogenność, toksyczność lub trudności z produkcją na dużą skalę [84].

W podobny sposób CPP znacznie zwiększają przenikanie biofarmaceutyków opartych na siRNA. Koniugaty mogą być tu tworzone zarówno kowalencyjnie, jak i niekowalencyjnie, aczkolwiek te drugie wykazują większą wydajność [85]. Na przykład udowodniono, że podawany dożylnie koniugat peptydu MPG z siRNA cykliny B1 (białko pełniące istotną rolę w cyklu komórkowym) powodował zahamowanie wzrostu nowotworu [86].

Z pomocą CPP transportowane do wnętrza komórek mogą być nawet bardzo duże białka. Koniugaty takie otrzymywane są głównie z wykorzystaniem wiązań kowalencyjnych. Koniugat peptydu Tat z  $\beta$ -galaktozydazą (około 117 kDa) był w stanie przeniknąć do wszystkich komórek myszy, w tym również do mózgu [8]. Niestety aktywność białek zależy w dużym stopniu od ich wrażliwej struktury wyższego rzędu, która może zostać utracona w czasie tworzenia koniugatów lub podczas ich transportu, co może przekładać się na niską skuteczność takiego leku.

Kolejną grupą związków, których przenikanie przez błony komórkowe zostało poprawione dzięki koniugatom z CPP, są nanocząstki. Mogą one znaleźć zastosowanie w terapii przeciwdrobnoustrojowej, przeciwnowotworowej lub jako kontrast w badaniach rezonansem magnetycznym. Przykładem zastosowania takiego podejścia mogą być nanocząsteczki superparamagnetycznego tlenku żelaza w połączeniu z polimerem, na którym osadzono łańcuchy peptydu Tat. W badaniach przenikalności na komórkach Caco-2 (linia komórkowa pochodząca z gruczołaka jelita grubego) połączenie takie wykazało znacznie większą przenikalność niż identyczne nanocząsteczki pozbawione peptydu Tat [87].

Przykładami leków, których efektywność można zwiększyć w wyniku poprawy ich biodostępności poprzez połączenie z CPP mogą być np.  $\delta$ -peptydowy inhibitor kinazy proteinowej C, którego koniugat z peptydem Tat ma potencjalne zastosowanie przy ostrym zawale serca [88], czy też cyklosporyna A, która w formie koniugatu z poliargininą może być skuteczna w leczeniu łuszczycy [89].

## PODSUMOWANIE

Peptydy penetrujące z pewnością są wyjątkową i ciekawą grupą związków peptydowych. Zostały odkryte ponad dwadzieścia lat temu, ale wiedza na ich temat wciąż jest rozbudowywana. Liczne badania nad mechanizmami ich przenikania do wnętrza komórek pozwalają zrozumieć jakie cechy strukturalne warunkują ich zdolność do penetracji komórek. Wiedza ta pozwala na projektowanie nowych, bardziej efektywnych peptydów penetrujących., które mogą być wykorzystane do konstrukcji kolejnych chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych lub przeciwnowotworowych.

## PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania dla prof. M. J. Milewskiej za pomoc i cenne uwagi merytoryczne oraz techniczne.

Podziękowania dla p. Anny Łuki za wykonanie rysunków według wskazówek autorów.

Praca zrealizowana dzięki finansowaniu ze środków Narodowego Centrum Nauki UMO-2012/05/B/ST5/00291.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A.D. Frankel, C.O. Pabo, *Cell*, 1988, **55**, 1189.
- [2] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 1864.
- [3] U. Langel, *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*, Taylor&Francis, London 2007.
- [4] C. Foerg, H.P. Merkle, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 144.
- [5] C. Bechara, S. Sagan, *FEBS Lett.*, 2013, **587**, 1693.
- [6] A. Prochiantz, *Cell Biol.*, 2000, **12**, 400.
- [7] A.M. Gewirtz, D.L. Sokol, M.Z. Ratajczak, *Blood*, 1998, **92**, 712.
- [8] S.R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S.F. Dowdy, *Science*, 1999, **285**, 1569.
- [9] J.B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P.L. McGrane, P.A. Wender, P.A. Khavari, *Nat. Med.*, 2000, **6**, 1253.
- [10] J. Yuan, A. Kramer, F. Eckerdt, M. Kaufmann, K. Strebhardt, *Cancer Res.*, 2002, **62**, 4186.
- [11] K. Kilk, M. Magzoub, M. Pooga, L.E. Eriksson, U. Langel, A. Graslund, *Bioconjug. Chem.*, 2001, **12**, 911.
- [12] M. Pooga, A. Jureus, K. Razaee, H. Hasanvan, K. Saar, K. Kask, P. Kjellen, T. Land, J. Halonen, U. Maeorg, A. Uri, S. Solyom, T. Bartfai, U. Langel, *J. Pept. Res.*, 1998, **51**, 65.
- [13] F. Simeoni, M. C. Morris, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 2717.
- [14] K. Takeshima, A. Chikushi, K.K. Lee, S. Yonehara, K. Matsuzaki, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 1310.
- [15] C. Rousselle, M. Smirnova, P. Clair, J.M. Lefauconnier, A. Chavanieu, B. Calas, J.M. Scherrmann, J. Tamsamani, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, **296**, 124.
- [16] A. Muñoz, B. López-García, J.F. Marcos, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, **50**, 384.

- [17] Z. Machova, C. Muhle, U. Krauss, R. Trehin, A. Koch, H.P. Merkle, A.G. Beck-Sicking, *Chem. Biochem.*, 2002, **3**, 672.
- [18] J. Fernandez-Carneado, M.J. Kogan, S. Castel, E. Giralt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, **43**, 1811.
- [19] Y.-Z. Lin, S. Yao, R.A. Veach, T.R. Torgerson, J. Hawiger, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 14255.
- [20] M. Zorko, U. Langel, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, **57**, 529.
- [21] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, R.S. Lewis, B.A. Murray, P. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 9506.
- [22] K.-T. Jeang, H. Xiao, E.A. Rich, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 28837.
- [23] D.J. Mitchell, D.T. Kim, L. Steinman, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, *J. Pept. Res.* 2000, **56**, 318.
- [24] A. Prochiantz, A. Joliot, *Mol. Cell Biol.*, 2003, **4**, 814.
- [25] I. Le Roux, S. Duharcourt, M. Volovitch, A. Prochiantz, E. Ronchi, *FEBS Lett.*, 1995, **368**, 311.
- [26] D. Derossi, A. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 10444.
- [27] G. Drin, H. Déméné, J. Tamsamani, R. Brasseur, *Biochemistry*, 2001, **40**, 1824.
- [28] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A.R. Rees, J. Tamsamani, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 31192.
- [29] J. F. Marcos, M. Gandía, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2009, **4**, 659.
- [30] L. Carmona, M. Gandía, B. López-García, J.F. Marcos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, **417**, 56.
- [31] M. Pooga, M. Hällbrink, M. Zorko, U. Langel, *FASEB J.*, 1998, **12**, 67.
- [32] S. Pujals, J. Fernández-Carneado, C. López-Iglesias, M.J. Kogan, E. Giralt, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 264.
- [33] Y.A. Fillon, J.P. Anderson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11798.
- [34] T. Jiang, E.S. Olson, Q.T. Nguyen, M. Roy, P.A. Jennings, R.Y. Tsien, *PANS*, 2004, **101**, 17867.
- [35] E.S. Olson, T.A. Aguilera, T. Jiang, L.G. Ellies, Q.T. Nguyen, E.H. Wong, L.A. Grossaf, R.Y. Tsien, *Integr. Biol.*, 2009, **1**, 382.
- [36] H. Xia, G. Gu, Q. Hu, Z. Liu, M. Jiang, T. Kang, D. Miao, Q. Song, L. Yao, Y. Tu, H. Chen, X. Gao, J. Chen, *Bioconjug. Chem.*, 2013, **24**, 419.
- [37] F. Miletti, *Drug Discov. Today*, 2012, **17**, 850.
- [38] J. Gomez, S. Matsuyama, *Methods Mol. Biol.*, 2011, **683**, 465.
- [39] J.R. Marks, J. Placone, K. Hristova, W.C. Wimley, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 8995.
- [40] F. Nakayama, T. Yasuda, S. Umeda, M. Asada, T. Imamura, V. Meineke, M. Akashi, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 25823.
- [41] C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I. D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 33957.
- [42] K. Park, *J. Control. Release.*, 2011, **153**, 117.
- [43] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, *PNAS*, 2000, **97**, 1300.
- [44] M. Magzoub, L.E. Eriksson, A. Graslund, *Vesicles Biophys. Chem.*, 2003, **103**, 271.
- [45] D.I. Chan, E.J. Prenner, H.J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1184.
- [46] C. Bechara, M. Pallerla, Y. Zaltsman, F. Burlina, I.D. Alves, O. Lequin, S. Sagan, *FASEB J.*, 2012, **27**, 738.
- [47] E.P. Loret, E. Vives, P.S. Ho, H. Roach, J.J. Van Rietschoten, W.C. Johnson, *Biochemistry*, 1991, **30**, 6013.
- [48] E. Vives, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 16010.
- [49] E. Vives, C. Granier, P. Prevot, B. Lebleu, *Lett. Pept. Sci.*, 1997, **4**, 429.
- [50] T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 2437.
- [51] E. Vives, J. Richard, C. Rispal, B. Lebleu, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2003, **2**, 125.
- [52] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L.V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 585.

- [53] P.E.G. Thorén, D. Persson, E.K. Esbjörner, M. Goksör, P. Lincoln, B. Nordén, *Biochemistry*, 2004, **43**, 3471.
- [54] A. Ziegler, X. L. Blatter, A. Seelig, J. Seelig, *Biochemistry*, 2003, **42**, 9185.
- [55] A. Ziegler, J. Seelig, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 254.
- [56] S. Console, C. Marty, C. García-Echeverría, R. Schwendener, K. Ballmer-Hofer, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 35109.
- [57] J.P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu, L.V. Chernomordik, *J. Biochem.*, 2005, **280**, 15300.
- [58] A. Vendeville, F. Rayne, A. Bonhoure, N. Bettache, P. Montcourrier, B. Beaumelle, *Mol. Biol. Cell*, 2004, **15**, 2347.
- [59] T.B. Potocky, A.K. Menon, S.H. Gellman, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 50188.
- [60] P. Sazani, S.H. Kang, M.A. Maier, C. Wei, J. Dillman, J. Summerton, M. Manoharan, R. Kole, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 3965.
- [61] I.M. Kaplan, J.S. Wadia, S.F. Dowdy, *J. Control. Release*, 2005, **102**, 247.
- [62] A. Fittipaldi, A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram, M. Giacca, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 34141.
- [63] A. Mishra, G.H. Lai, N.W. Schmidt, V.Z. Sun, A.R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T.J. Deming, D.T. Kamei, G.C.L. Wong, *PNAS*, 2011, **108**, 16883.
- [64] P.M. Fischer, N.Z. Zhelev, S. Wang, J.E. Melville, R. Fähræus, D.P. Lane, *J. Pept. Res.*, 2000, **55**, 163.
- [65] D. Derossi, S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 18188.
- [66] G. Mainguy, M.L. Montesinos, B. Lesaffre, B. Zevnik, M. Karasawa, R. Kothary, W. Wurst, A. Prochiantz, M. Volovitch, *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**, 746.
- [67] B. Christiaens, J. Grooten, M. Reusens, A. Joliot, M. Goethals, J. Vandekerckhove, A. Prochiantz, M. Rosseneu, *Eur. J. Biochem.*, 2004, **271**, 1187.
- [68] P.A. Wender, W.C. Galliher, E.A. Goun, L.R. Jones, T.H. Pillow, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 452.
- [69] B. López-García, J.F. Marcos, C. Abad, E. Pérez-Payá, *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, **1660**, 131.
- [70] B. López-García, W. Ubhayasekera, R.L. Galloc, J.F. Marcos, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, **356**, 107.
- [71] A. Muñoz, J.F. Marcos, N.D. Read, *Mol. Microb.*, 2012, **85**, 89.
- [72] Y. Shai, *Biopolymers*, 2002, **66**, 236.
- [73] R. Fischer, M. Fotin-Mleczeck, H. Hufnagel, R. Brock, *ChemBioChem.*, 2005, **6**, 2126.
- [74] A. Muñoz, E. Harries, A. Contreras-Valenzuela, L. Carmona, N.D. Read, J.F. Marcos, *PloS ONE*, 2013, **8**, e54813.
- [75] H. Binder G. Lindblom, *Biophys. J.*, 2003, **85**, 982.
- [76] P. Joanne, C. Galanth, N. Goasdoué, P. Nicolas, S. Sagan, S. Lavielle, G. Chassaing, C. El Amri, I.D. Alves, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 1772.
- [77] J.S. Wadia, S.F. Dowdy, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2003, **4**, 97.
- [78] A. Astriab-Fisher, D. Sergueev, M. Fisher, B.R. Shaw, R.L. Juliano, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 744.
- [79] M. Pooga, U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J.X. Hao, X.J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hökfelt, T. Bartfai, U. Langel, *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**, 857.
- [80] M. Hällbrink, A. Florén, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai, U. Langel, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **101**, 1515.
- [81] R. Fischer, M. Fotin-Mleczeck, H. Hufnagel, R. Brock, *ChemBioChem.*, 2005, **6**, 2126.
- [82] C. Sparr, N. Purkayastha, B. Kolesinska, M. Gengenbacher, B. Amulic, K. Matuschewski, D. Seebach, F. Kamena, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, **57**, 4689.



- 
- [83] K. Kilk, S. El-Andaloussi, P. Järver, A. Meikas, A. Valkna, T. Bartfai, *J. Control. Release*, 2005, **103**, 511.
- [84] D.J. Glover, H.J. Lipps, D.A. Jans, *Nat. Rev. Genet.*, 2005, **6**, 299.
- [85] L. Crombez, A. Charnet, M.C. Morris, G. Aldrian-Herrada, F. Heitz, G. Divita, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 44.
- [86] P. Kumar, H. Wu, J.L. McBride, K.E. Jung, M.H. Kim, B.L. Davidson, *Nature*, 2007, **7149**, 39.
- [87] C. Wang, L. Qiao, Q. Zhang, H. Yan, K. Liu, *Int. J. Pharm.*, 2012, **430**, 372.
- [88] J. Bian, Z.B. Popovic, C. Benejam, M. Kiedrowski, L.L. Rodriguez, *M.S. Penn, Circ. Res.*, 2007, **100**, 1626.
- [89] H. Lee, R. Jefferies, P. Watt, R. Hopkins, F. Sotzik, S. Reid, A. Armson, A. Boxell, U. Ryan, *Exp. Parasitol.*, 2008, **118**, 303.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 grudnia 2014

