

## Dosage et pistage de peptides Troyens dans les cellules

par Sandrine Sagan, Fabienne Burlina, Diane Delaroche, Baptiste Aussedat, Soline Aubry, Gérard Bolbach, Solange Lavielle & Gérard Chassaing

Université Pierre et Marie Curie, UMR 7613 CNRS, case courrier 182, 4 place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France.  
E-mail : sagan@ccr.jussieu.fr

Reçu le 6 mars 2006

### RÉSUMÉ

Les peptides Troyens ou vecteurs sont capables de passer les membranes biologiques et de véhiculer des principes actifs dans le cytoplasme ou le noyau des cellules dans lesquelles ils sont entrés. Les méthodes indirectes utilisées jusqu'à présent pour détecter ces peptides dans les cellules n'ont pas permis d'établir

de manière univoque le(s) mécanisme(s) de leur internalisation. La méthode de quantification, basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF, que nous avons mise au point pour quantifier ces peptides Troyens dans les cellules est développée dans cette revue.

### SUMMARY Tracking Trojan peptides in cells

Trojan peptides or cell-penetrating peptides (CPP) are natural or designed peptides identified as cellular membrane-crossing molecules, in particular through their potency to vehiculate various kinds of compounds to the cytoplasm and nucleus of living cells. The indirect methods used so far to detect these pep-

tides in cells led to controversial hypotheses on the mechanism of their cell entry. Therefore, we have developed a MALDI-TOF mass spectrometry-based quantification method to track these peptides inside cells. This new method is presented in this review.

### ÉTAT DE L'ART

Vers la fin des années 80, la protéine tat (86-amino acides) du virus de l'immunodéficience humaine (Frankel & Pabo, 1988) et le polypeptide de 60 résidus, homéodomaine d'*antennapedia* (Joliot *et al.*, 1991), furent les premiers exemples décrits de protéines capables de passer les membranes cellulaires. Dans ces protéines, un peptide de seize résidus correspondant à l'hélice 3 de l'homéodomaine pour *antennapedia* (Derossi *et al.*, 1994) et un peptide de douze résidus pour la protéine tat (Vives *et al.* 1997) sont responsables de cette propriété unique. Depuis, de nombreux peptides pénétrant les cellules (cell-penetrating peptide ou CPP), peptides Troyens ou peptides de transduction (protein-transduction domain ou PTD) ont été décrits (Joliot & Prochiantz, 2004 ; Jarver & Langel, 2004).

Naturels ou conçus rationnellement (Fig. 1), ces peptides sont capables de véhiculer dans le cytoplasme et/ou le noyau des cellules toutes sortes de molécules telles que des protéines, des inhibiteurs d'enzyme, des oligonucléotides, des anticorps, des agents de contraste (utilisés en imagerie), des toxines, ou des nanoparticules (Dietz & Bähr, 2004).

Le mécanisme d'entrée de ces peptides/protéines dans les cellules, température- ou énergie-dépendant, est largement controversé dans la littérature. En effet, tous les phénomènes qui rendent compte du passage d'une molécule du milieu extracellulaire vers le cytosol ont été avancés comme mécanisme probable d'entrée de ces peptides : micelles inverses (Berlose *et al.*, 1996 ; Derossi *et al.*, 1998), endocytose dépendant de la clathrine ou à cavéole (Fotin-Mleczek *et al.*, 2005 ; Ross *et al.*, 2004 ; Saalik *et al.*, 2004 ; Vendeville *et al.*, 2004 ; Vives, 2003), macropinocytose (Wadia *et al.*, 2004 ; Wang & El-Deiry, 2004), potentiel membranaire (Rothbard *et al.*, 2004, 2005 ; Ziegler *et al.*, 2003). Cependant, il semble de plus en plus évident que le mécanisme d'entrée dans les cellules dépend fortement de la nature chimique et de la taille du CPP (Goncalves *et al.*, 2005), mais également de la nature chimique de la molécule-cargaison à transporter (Maiolo *et al.*, 2005). Ainsi, l'incorporation sur un CPP d'une sonde fluorescente (largement utilisée pour visualiser l'entrée cellulaire de ces peptides), assimilable à une cargaison hydrophobe, change les propriétés d'interaction du peptide avec la membrane de telle sorte que, dans certains cas, cette addition confère au CPP des propriétés cytotoxiques non voulues (Jones *et al.*, 2005).

Pénétratine (hélice 3 [43-58] <i>antennapedia</i> )	RQIKIWFQNRRMKWKK
Tat(48-60)	RKKRRQRRRPPQC
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
MAP (Model Amphipathic Peptide)	KLALKLALKALKAAALKLA
NLS (Nuclear Localization Signal)	KSRKRKL
MTS (Membrane Transduction Sequence)	YARAAARQARA
Polyarginine ou polylysine	RRRRRRRRR

- Derossi, Calvet, Trembleau, Brunissen, Chassaing, Prochiantz (1994) J. Biol. Chem. 269, 10444.
- Vivès, Brodin, Lebleu (1997), J. Biol. Chem. 272, 16010.
- Pooga, Hallbrink, Zorko, Langel (1998) FASEB J. 12, 67.
- Mitchell, Kim, Steinman, Fathman, Rothbard (2000) J. Pept. Res. 56, 318.

FIG. 1. – Séquence primaire de quelques peptides Troyens naturels ou conçus rationnellement : ces peptides sont aussi appelés peptides vecteurs, CPP (*cell-penetrating peptide*), PTD (*protein-transduction domain*), CTP (*cytoplasmic transduction peptide*).

Le seul point de consensus de ces études sur les CPP est que la plupart d'entre eux contient des acides aminés basiques les dotant d'une charge nette positive, cruciale pour leur entrée dans les cellules (Jiang *et al.*, 2004). Ainsi, la première étape du processus d'internalisation ferait intervenir une interaction des charges positives du peptide, notamment des groupes guanidiniums des résidus arginyl, avec des charges négatives présentes au niveau des protéoglycans (sulfates, carboxylates) ou des phospholipides (phosphates) de la membrane (Pujals *et al.*, 2006; Rothbard *et al.*, 2002). Par ailleurs, la nécessité d'une balance subtile entre le nombre de résidus basiques et hydrophobes et d'une structure en hélice amphiphile, requise pour la translocation membranaire de ces peptides, est un point encore largement discuté dans la littérature (Balayssac *et al.*, 2006; Chassaing *et al.*, 2006).

Enfin, les données concernant le devenir et le catabolisme de ces peptides à l'intérieur des cellules sont *quasi* inexistantes. La raison essentielle est que les peptides Troyens sont généralement pistés dans les cellules *via* une étiquette rapporteuse (isotope radioactif, marqueur fluorescent, biotine, peroxydase, etc.). La méthodologie de détection ensuite utilisée (HPLC, microscopie confocale, microscopie de fluorescence, FACS, AFM, etc.) ainsi que le traitement appliqué aux cellules après incubation, pour s'affranchir du peptide éventuellement « collé à la membrane », sont capitaux (Chassaing *et al.*, 2006). En effet, certaines de ces méthodes, d'imagerie en particulier, ne peuvent évidemment pas rendre compte de l'intégrité moléculaire du peptide détecté dans les cellules. Pour cette raison, les données de la littérature concernant la quantification de ces peptides dans les cellules sont loin d'être convergentes, comme l'illustrent les coefficients de translocation publiés dans la littérature et qui sont regroupés dans le tableau I.

Pour toutes les raisons évoquées ci-dessus, nous avons cherché à mettre au point une méthode de quantification

fiable et reproductible, et qui permette de suivre l'état moléculaire de ces peptides dans les cellules.

#### DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE QUANTIFICATION BASÉE SUR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF

La spectrométrie de masse basée sur les processus de désorption / ionisation laser assistés par une matrice et analyse en temps de vol (MALDI-TOF) n'est, à l'origine, pas une méthode d'analyse quantitative et ce, pour différentes raisons (rendement d'ionisation, effet de suppression de signal...) que nous ne développerons pas ici (Ong & Mann, 2005). L'artifice utilisé pour contrebalancer cet inconvénient est d'utiliser comme standard interne la molécule à quantifier elle-même mais porteuse d'isotopes stables. En effet, les deux molécules seront alors chimiquement identiques et présenteront les mêmes propriétés de désorption/ionisation et détection dans le spectromètre de masse MALDI-TOF, mais seront distinguées par leur masse moléculaire (Gobom *et al.*, 2000).

Le protocole que nous avons mis au point sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) est décrit sur la figure 2 (Burlina *et al.*, 2005). Le peptide Troyen est synthétisé avec une extension N-terminale composée de quatre résidus glycyl (sous forme hydrogène (<sup>1</sup>H) ou deutérium (<sup>2</sup>H) donnant une différence de masse globale entre les deux peptides de 8 u) et d'une biotine (pour la purification à l'aide de billes magnétiques fonctionnalisées à la streptavidine).

Brièvement, les cellules CHO sont pré-ensemencées dans une boîte multipuits afin d'avoir un million de cellules adhérentes lors de l'expérience. Les cellules sont lavées avec le milieu de culture DMEM sans sérum de veau fœtal puis incubées à 37° C avec le peptide Troyen (7,5 µM). En fin d'incubation, les cellules sont à nouveau

TABLEAU I. – Coefficients de translocation  $K_T$  calculés à partir des données de la littérature. Le coefficient de translocation  $K_T$  correspond au rapport des concentrations intra- sur extra- cellulaires obtenues après 90 minutes d'incubation avec le peptide. Il permet de comparer les efficacités d'internalisation de différents CPP. Un rapport de 1 correspond à une équilibration des concentrations des deux compartiments intra- et extracellulaires. Le type cellulaire, la méthodologie suivie après incubation et la précision des méthodes d'analyse pourraient contribuer à ces différences. Les quantités de peptides détectées, après extraction par un mélange d'huile, après dégradation enzymatique, directement par microscopie à corrélation de fluorescence dans des petits volumes cellulaires ou par électrophorèse capillaire du contenu cellulaire, sont similaires et conduisent à des  $K_T$  inférieures à l'unité.

Type cellulaire	(A) HT1080 <sup>2</sup> (B) CAE <sup>1</sup>	(C) Bowes Melanoma <sup>3</sup>	(C) RAW264.7, HeLa, COS7 <sup>4</sup>	(D) SKMel37 <sup>5</sup>	(C) Caco <sup>6</sup>	(E) MDCK <sup>7</sup> Jurkat <sup>8,9</sup>	(F) CHO <sup>10</sup>
H3Antp/penetratin RQIKIWFQNRRMKWKK	5	71		0,2 ± 0,2	75		0,6
MAP KLALKLALKALKAAALKLA	5	484					
Transportan GWTLSAGYLLGKINLK- ALAALAKKIL		353			200	3	
TAT(48-60) ou (49-57) GRKKRRQRRRPQ	0,1	107	50 ± 15			30 et 0,3	0,1
R8 ou R9 RRRRRRRRR			50 ± 15			3	0,9

A - Peptide fluorescent analysé par HPLC. B - Peptide fluorescent analysé par électrophorèse capillaire. C- Mesure de l'intensité de fluorescence moyenne. D - Mesure des fluctuations de fluorescence (FCM). E - Mesure de peptide radioactif. F - Mesure par spectrométrie de masse en utilisant un étalon interne.

<sup>1</sup> Oehlke *et al.*, 1998; <sup>2</sup> Soughayer *et al.*, 2004; <sup>3</sup> Hällbrink *et al.*, 2001; <sup>4</sup> Suzuki *et al.*, 2002; <sup>5</sup> Fischer *et al.*, 2002; <sup>6</sup> Lindgren *et al.*, 2004; <sup>7</sup> Pooga *et al.*, 1998; <sup>8</sup> Polyakov *et al.*, 2000; <sup>9</sup> Gammon *et al.*, 2003; <sup>10</sup> Burlina *et al.*, 2005.

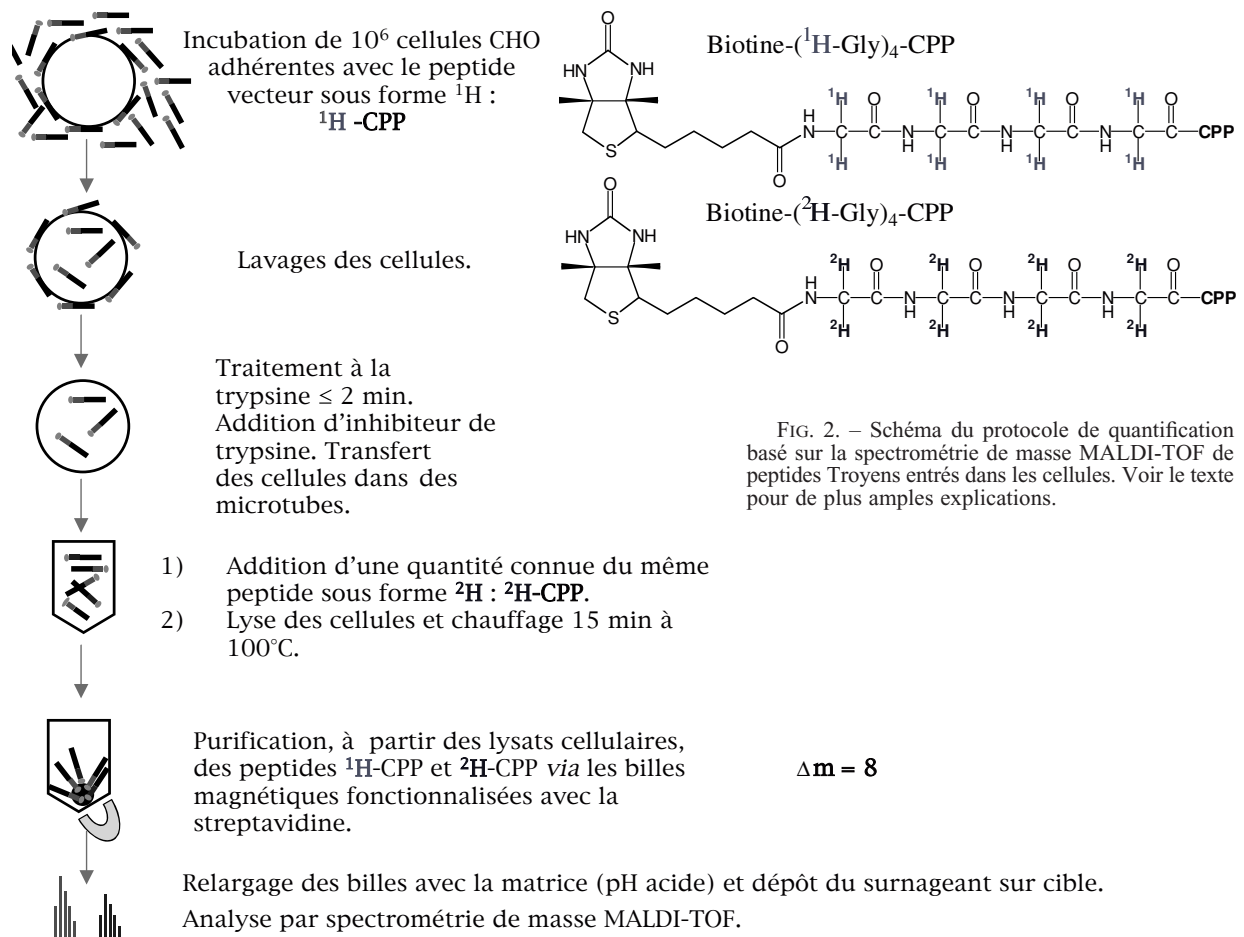


FIG. 2. – Schéma du protocole de quantification basé sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF de peptides Troyens entrés dans les cellules. Voir le texte pour de plus amples explications.

lavées avec le milieu de culture DMEM, et traitées pendant un temps court (environ 2 minutes à 37° C) avec de la trypsine (dégradation du peptide membranaire et décollement des cellules adhérentes sur le plastique des boîtes multipuits). Après addition à 4° C de l'inhibiteur de trypsine de soja, les cellules sont transférées dans des microtubes et deux étapes de centrifugation sont réalisées afin d'éliminer la trypsine restante ainsi que les fragments de dégradation du peptide Troyen non internalisé. Une quantité connue du peptide Troyen sous sa forme deutériée est alors ajoutée, en même temps que le tampon de lyse. Le mélange est immédiatement chauffé pendant 15 minutes à 100° C (destruction des interactions potentielles du peptide Troyen avec des cibles intracellulaires ainsi que des activités enzymatiques relarguées lors de la lyse cellulaire). Après ajout d'un nouveau tampon compatible avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec la streptavidine, ces dernières sont ajoutées au mélange pendant une heure à température ambiante. Des lavages plus ou moins stringents des billes sont enfin effectués avant l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Girault *et al.*, 1996a, b). Une fois le spectre de masse obtenu, la quantité de peptide <sup>1</sup>H internalisé est déterminée par le rapport des aires des massifs

isotopiques correspondant aux deux peptides <sup>1</sup>H et <sup>2</sup>H (de quantité connue) comme l'illustre la figure 3.

### EFFICACITÉ D'INTERNALISATION DE LA PÉNÉTRATINE, tat(48-59), R9 ET Kno

Les premiers peptides Troyens dont nous avons quantifié l'internalisation sont la pénétratine, Tat(48-59), R9 et l'hélice III de l'homéodomaine de Knotted (Kno). Pour la pénétratine (Fig. 3), l'efficacité d'internalisation (résultant de l'entrée, la dégradation éventuelle, la res-sortie potentielle) du peptide entier à 75 minutes est de 3,4 μM (Burlina *et al.*, 2005). La même quantité est déterminée lorsque les peptides Troyens sont utilisés en mélange ou seuls. Ainsi l'ordre d'efficacité d'internalisation relative des quatre peptides Troyens a pu être déterminé : Kno (25 μM) > R9 (4,5 μM) ≈ pénétratine (3,5 μM) > Tat(48-59) (0,65 μM) (Aussedat *et al.*, 2006 ; Burlina *et al.*, 2005).

Nous avons aussi montré que les étapes de trypsino-lyse et de chauffage lors de la lyse sont essentielles à la quantification. En effet, sans traitement à la trypsine, des

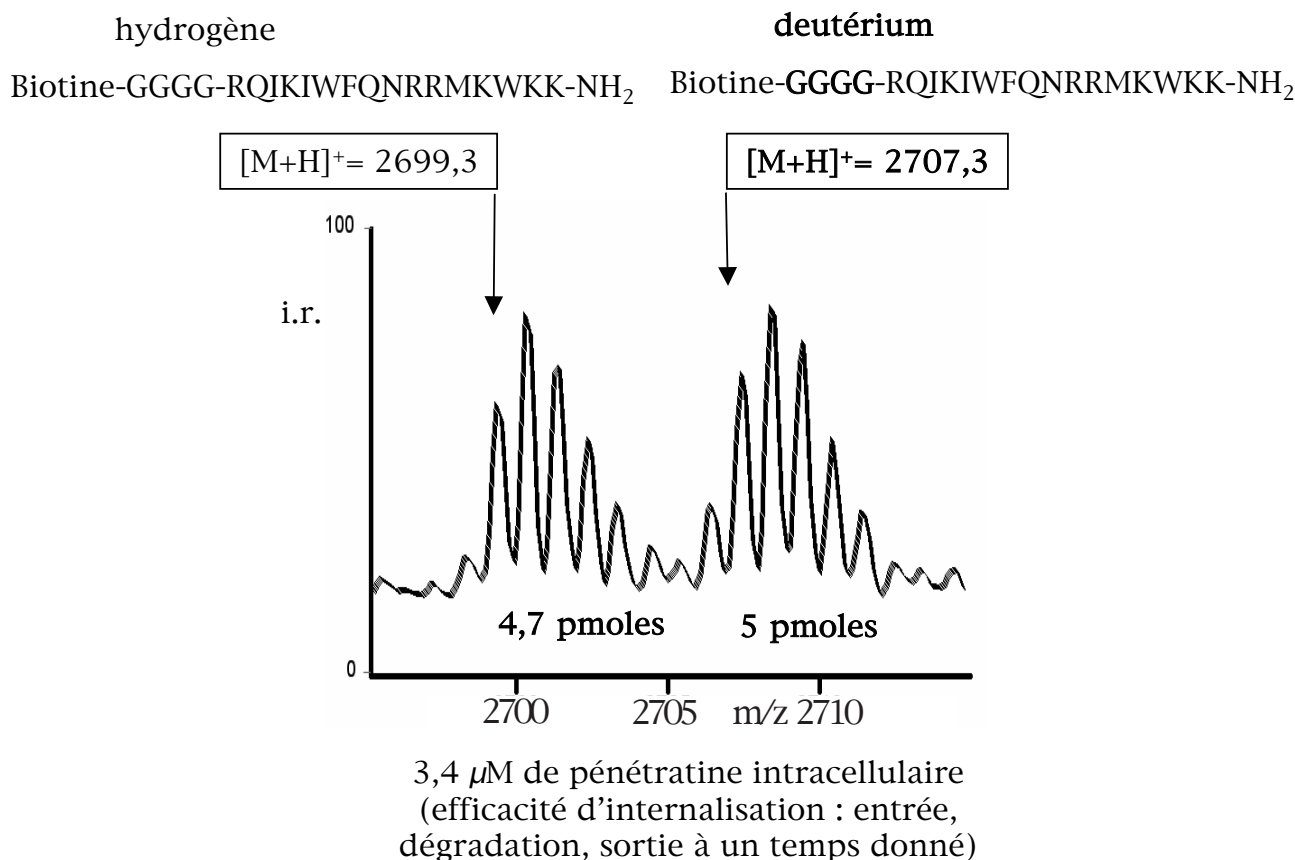


FIG. 3. – Quantification de la pénétratine dans les cellules CHO-K1. 10<sup>6</sup> cellules adhérentes (volume de 1,5 pL par cellule) sont incubées 75 minutes à 37° C avec 7,5 μM de <sup>1</sup>H-pénétratine. Le peptide <sup>2</sup>H-pénétratine (5 pmoles) ajouté à l'étape de lyse sert de standard interne dans le spectre de masse MALDI-TOF afin de quantifier le peptide internalisé <sup>1</sup>H par rapport des aires des deux massifs isotopiques.

quantités de 5 à 60 fois plus importantes selon le peptide sont mesurées (Burlina *et al.*, 2005). Ces quantités correspondent au peptide collé à la membrane qu'il n'est pas possible d'éliminer par de simples lavages. Par ailleurs, en absence d'étape de chauffage, les enzymes intracellulaires relarguées lors de l'étape de lyse cellulaire dégradent les deux peptides  $^1\text{H}$  et  $^2\text{H}$ . Sans cette étape de chauffage, un biais serait donc introduit et la quantité mesurée de peptide internalisé, erronée.

## PERSPECTIVES : QUANTIFICATION ET PISTAGE DES PEPTIDES TROYENS DANS LES CELLULES

Ce protocole nous permet donc de quantifier sans aucun problème les peptides Troyens internalisés. Cependant, nous ne pouvons pas suivre sur le plan du catabolisme un peptide dans les cellules. La raison est qu'en cas de dégradation enzymatique poussée de ces peptides (par les enzymes lysosomaux, le protéasome), les masses moléculaires des fragments auxquels il faut s'attendre dans le spectre sont inférieures à 500. Or, l'observation de telles basses masses par spectrométrie de masse MALDI est rendue difficile par la présence, dans cette gamme, de pics spécifiques de la matrice (utilisée pour l'analyse MALDI) qui interfèrent avec les pics à étudier. Pourtant, il est fondamental de pouvoir suivre, sur le plan du catabolisme, le devenir de ces peptides dans les cellules, car il renseigne sur leur trafic intracellulaire et donc sur le(s) mécanisme(s) de leur entrée.

Pour cette raison, nous avons conçu et synthétisé une étiquette rapporteuse, stable à la protéolyse et de masse supérieure à 500 (Fig. 4) (Delaroche *et al.*, manuscrit soumis). Cette étiquette a pour séquence : trifluoroacétyl-( $\alpha,\alpha$ -diéthyl)Gly-Lys(Nebiotine)-(D)Lys-Cys. Dans cette séquence le bras diéthyl peut être introduit sous la forme  $^1\text{H}$  ou  $^2\text{H}$  afin de permettre la quantification selon la méthode décrite précédemment. Le résidu lysyl de configuration D confère une stabilité enzymatique à l'étiquette. La biotine présente sur la chaîne latérale de la (L)lysine est utilisée pour la purification des peptides et la cystéine C-terminale permet le couplage d'une molécule-cargaion *via* un pont disulfure.

Les premières études ont été menées avec cette étiquette rapporteuse, greffée sur un analogue court, (RW)<sub>9</sub>, du peptide Troyen (RW)<sub>16</sub> (Derossi *et al.*, 1998). Le peptide conserve les propriétés d'internalisation du 16-mer avec une efficacité d'internalisation de 25  $\mu\text{M}$  après 75 minutes d'incubation avec les cellules CHO (Delaroche *et al.*, manuscrit soumis). Les études de dégradation, après incubation dans un lysat de cellules CHO, montrent que le plus petit fragment détectable par spectrométrie de masse est effectivement l'étiquette qui s'accumule en 30 minutes (Fig. 5). La même analyse menée après internalisation du peptide dans les cellules montre la présence de tous les fragments peptidiques jusqu'à l'étiquette, sans accumulation d'un fragment particulier. Ces résultats suggèrent une localisation cytoplasmique du peptide entré par internalisation. Des études sont actuellement en cours afin de préciser le mécanisme d'entrée de ce peptide dans les

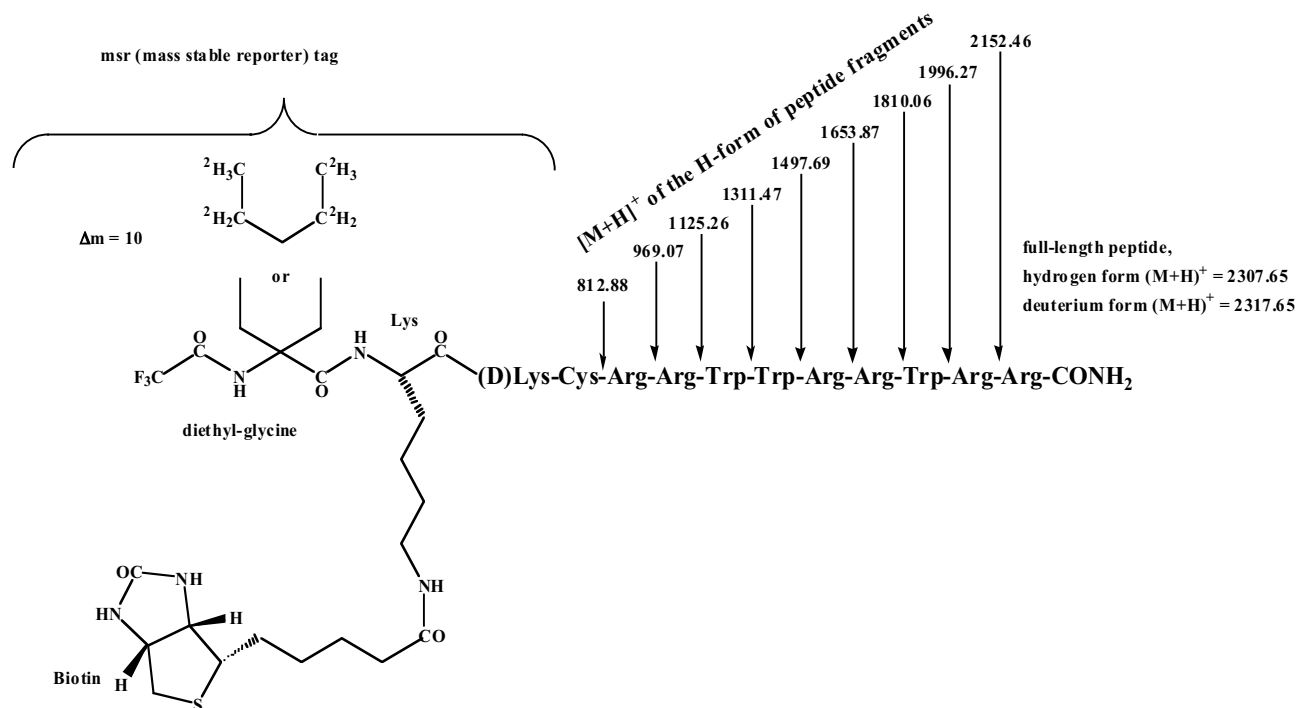


FIG. 4. – Schéma de l'étiquette rapporteuse, stable à la protéolyse, utilisée pour suivre le catabolisme des peptides Troyens dans les cellules. Cette étiquette a été additionnée à un nouveau peptide Troyen (RW)<sub>9</sub> (Delaroche *et al.*, manuscrit soumis).



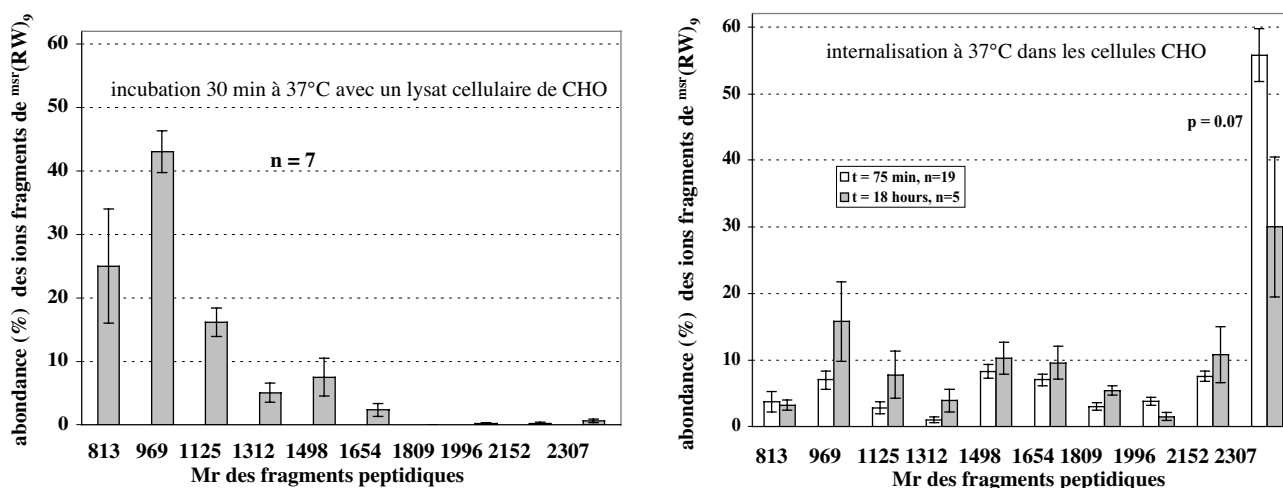


FIG. 5. – Stabilité de l'étiquette rapporteuse à la protéolyse. L'étiquette a été couplée au peptide Troyen (RW)<sub>9</sub>. Le peptide a été incubé avec un lysat traité à la sonication pour relarguer les enzymes intracellulaires des compartiments pendant 30 minutes à 37°C (graphe de gauche) ou bien incubé avec les cellules entières pendant 75 minutes pour internalisation (graphe de droite). L'abondance des ions, fragments de dégradation du peptide, a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

cellules, notamment en utilisant des inhibiteurs du métabolisme et de l'endocytose.

## CONCLUSIONS

Nous avons ainsi vu dans cette revue non-exhaustive les problèmes inhérents à l'étude, notamment du ou des mécanisme(s) d'entrée, des peptides Troyens dans les cellules. Le développement de la nouvelle méthodologie décrite ici, s'appuyant sur une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des peptides internalisés, devrait permettre, dans un avenir que nous ne pouvons souhaiter que proche, d'éclaircir la pléthore de données contradictoires de la littérature concernant ces peptides et le mécanisme de translocation membranaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aussedat B., Sagan S., Chassaing G., Bolbach G. & Burlina F., Quantification of the efficiency of cargo delivery by peptidic and pseudo-peptidic Trojan carriers using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1758, 375-383.
- Balayssac S., Burlina F., Convert O., Bolbach G., Chassaing G. & Lequin O., Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry*, 2006, 45, 1408-1420.
- Berlose J. P., Convert O., Derossi D., Brunissen A. & Chassaing G., Conformational and associative behaviours of the third helix of *antennapedia* homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.*, 1996, 242, 372-386.
- Burlina F., Sagan S., Bolbach G. & Chassaing G., Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, 44, 4244-4247.
- Chassaing G., Sagan S., Lequin O., Lamazière A., Ayala-Sanmartin J., Trugnan G., Bolbach G. & Burlina F., Inverted lipid models: "A pathway for peptide internalisation?" in *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*, 2006 (second edition), ed. Langel, Ü. (CRC press LLC), sous presse.
- Delaroché D., Aussedat B., Aubry S., Chassaing G., Burlina F., Clodic G., Bolbach G., Lavielle S. & Sagan S., Tracking a new cell-penetrating peptide, (RW)<sub>9</sub>, in cells through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag, soumis.
- Derossi D., Joliet A. H., Chassaing G. & Prochiantz A., The third helix of the *Antennapedia* homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 10444-10450.
- Derossi D., Chassaing G. & Prochiantz A., Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.*, 1998, 8, 84-87.
- Dietz G. P. H. & Bähr M., Delivery of bioactive molecules into cell: the Trojan horse approach. *Mol. Cell. Sci.*, 2004, 27, 85-131.
- Fischer R., Waizenegger T., Kohler K. & Brock R., A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1564, 365-374.
- Fotin-Mleczeck M., Welte S., Mader O., Duchardt F., Fischer R., Hufnagel H., Scheurich P. & Brock R., Cationic cell-penetrating peptides interfere with TNF signalling by induction of TNF receptor internalization. *J. Cell Sci.*, 2005, 118, 3339-3351.
- Frankel A. D. & Pabo C. O., Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988, 55, 1189-1193.
- Gammon S. T., Villalobos V. M., Prior J. L., Sharma V. & Piwnicka-Worms D., Quantitative analysis of permeation peptide complexes labeled with technetium-99m: chiral and sequence-specific effects on net cell uptake. *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14, 368-376.
- Girault S., Chassaing G., Blais J. C., Brunot A. & Bolbach G., Coupling of MALDI-TOF mass analysis to the separation of biotinylated peptides by magnetic streptavidin beads. *Anal. Chem.*, 1996a, 68, 2122-2126.
- Girault S., Sagan S., Bolbach G., Lavielle S. & Chassaing G., The use of photolabelled peptides to localize the substance-P-

- binding site in the human neurokinin-1 tachykinin receptor. *Eur. J. Biochem.*, 1996b, 240, 215-222.
- Gobom J., Kraeuter K. O., Persson R., Steen H., Roepstorff P. & Ekman R., Detection and quantification of neurotensin in human brain tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2000, 72, 3320-3326.
- Goncalves E., Kitas E. & Seelig J., Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry*, 2005, 44, 2692-2702.
- Hällbrink M., Floren A., Elmquist A., Pooga M., Bartfai T. & Langel U., Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1515, 101-109.
- Jarver P. & Langel U., The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov. Today*, 2004, 9, 395-402.
- Jiang T., Olson E. S., Nguyen Q. T., Roy M., Jennings P. A., Tsien R. Y., Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 17867-17872.
- Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H. & Prochiantz A., *Antennapedia* homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 1864-1868.
- Joliot A. & Prochiantz A., Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat. Cell Biol.*, 2004, 6, 189-196.
- Jones S. W., Christison R., Bundell K., Joyce C. J., Brockbank S. M. V., Newham P. & Lindsay M. A., Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Brit. J. Pharmacol.*, 2005, 145, 1093-1102.
- Lindgren M. E., Hällbrink M. M., Elmquist A. M. & Langel Ü., Passage of cell-penetrating peptides across a human epithelial cell layer *in vitro*. *Biochem. J.*, 2004, 377, 69-76.
- Maiolo, J.R., Ferrer, M., Ottinger, E.A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1712, 161-172.
- Oehlke, J., Scheller A., Wiesner B., Krause E., Beyermann M., Klauschenz E., Melzig M. & Bienert M., Cellular uptake of an  $\alpha$ -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1411, 127-139.
- Ong S.-E. & Mann M., Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chem. Biol.*, 2005, 1, 252-262.
- Polyakov V., Sharma V., Dahlheimer J. L., Pica C. M., Luker G. D. & Pivnicka-Worms D., Novel Tat-peptide chelates for direct transduction of technetium-99m and rhenium into human cells for imaging and radiotherapy. *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 762-771.
- Pooga M., Hällbrink M., Zorko M. & Langel Ü., Cell penetration by transportan. *FASEB J.*, 1998, 12, 67-77.
- Pujals S., Fernández-Carneado J., López-Iglesias C., Kogan M. J. & Giralt E., Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1758, 264-279.
- Ross M. F., Filipovska A., Smith R. A., Gait M. J. & Murphy M. P., Cell-penetrating peptides do not cross mitochondrial membranes even when conjugated to a lipophilic cation: evidence against direct passage through phospholipid bilayers. *Biochem. J.*, 2004, 383, 457-468.
- Rothbard J. B., Kreider E., VanDeusen C. L., Wright L., Wylie B. L. & Wender P. A., Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 3612-3618.
- Rothbard J. B., Jessop T. C., Lewis R. S., Murray B. A. & Wender P. A., Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 9506-9507.
- Rothbard J. B., Jessop T. C. & Wender P. A., Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005, 57, 495-504.
- Saalik P., Elmquist A., Hansen M., Padari K., Saar K., Viht K., Langel U. & Pooga M., Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study. *Bioconjug. Chem.*, 2004, 15, 1246-1253.
- Soughayer J. S., Wang Y., Li H., Cheung S. H., Rossi F. M., Stanbridge E. J., Sims C. E. & Allbritton N. L., Characterization of TAT-mediated transport of detachable kinase substrates. *Biochemistry*, 2004, 43, 8528-8540.
- Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K. & Sugiura Y., Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 2437-2443.
- Vendeville A., Rayne F., Bonhoure A., Bettache N., Montcourrier P. & Beaumelle B., HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol. Biol. Cell.*, 2004, 15, 2347-2360.
- Vives E., Cellular uptake of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. *J. Mol. Recognit.*, 2003, 16, 265-271.
- Vives E., Brodin P. & Lebleu B., A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 16010-160173.
- Wadia J. S., Stan R. V. & Dowdy S. F., Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.*, 2004, 10, 310-315.
- Wang W. & El-Deiry W. S., Targeting p53 by PTD-mediated transduction. *Trends Biotechnol.*, 2004, 22, 431-434.
- Ziegler A., Blatter X. L., Seelig A. & Seelig J., Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry*, 2003, 42, 9185-9194.