

Chaperon-Abgeleitete Kupfer(I)-Bindende Peptidnanofibrillen stören die Kupferhomöostase in Krebszellen

M. T. Jeena, Julian Link, Jian Zhang, Iain Harley, Petri Turunen, Robert Graf, Manfred Wagner, Luis Andre Baptista, Hendrik R. A. Jonker, Liyang Cui, Ingo Lieberwirth, Katharina Landfester, Jianghong Rao,* David Y. W. Ng,* und Tanja Weil*

Abstract: Kupfer (Cu) ist ein Übergangsmetall, das eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel spielt. Die Cu⁺-Homöostase ist in vielen Krebsarten hochreguliert und trägt zur Tumorentstehung bei. Therapeutische Strategien zur gezielten Beeinflussung der Cu⁺-Homöostase in Krebszellen werden jedoch selten erforscht, da kleine Cu⁺-Chelatoren eine geringere Bindungsaffinität aufweisen als intrazelluläre Cu⁺-Chaperone, Enzyme oder Liganden. Um dieses Problem anzugehen, stellen wir einen supramolekularen Ansatz vor, der von Cu⁺-Chaperonen inspiriert ist, um die Cu⁺-Homöostase in Krebszellen zu stören und somit den programmierten Zelltod zu induzieren. Das Peptid Nap-FFMTCGGCR bildet in Krebszellen Nanofibrillen aus, die aufgrund des einzigartigen MTCGGC-Motivs, das in intrazellulären Cu⁺-Chaperonen konserviert ist, eine hohe Bindungsaffinität und Selektivität für Cu⁺ aufweisen. Nap-FFMTCGGCR zeigt Zytotoxizität gegenüber dreifach negativen Brustkrebszellen (MDA-MB-231), beeinträchtigt die Aktivität des Cu⁺-abhängigen Co-Chaperons Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) und induziert oxidativen Stress. Im Gegensatz dazu hat Nap-FFMTCGGCR nur minimale Auswirkungen auf normale HEK 293T-Zellen. Kontrollpeptide zeigen, dass Selbstassemblierung und Cu⁺-Bindung synergistisch wirken müssen, um die Cu⁺-Homöostase erfolgreich zu stören. Wir zeigen, dass die durch Assemblierung verstärkte Affinität für Metallionen neue therapeutische Strategien eröffnet, um krankheitsrelevante Metallionen-Homöostase anzugehen.

[*] Dr. M. T. Jeena, J. Link, J. Zhang, I. Harley, Dr. R. Graf, Dr. M. Wagner, Dr. L. A. Baptista, Dr. I. Lieberwirth, Dr. K. Landfester, Dr. D. Y. W. Ng, Prof. Dr. T. Weil
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz, Deutschland
E-mail: tweil@mpip-mainz.mpg.de
david.ng@mpip-mainz.mpg.de

Dr. L. Cui, Dr. J. Rao
Department of Radiology
Molecular Imaging Program at Stanford
School of Medicine
Stanford University
Stanford, CA 94305, USA
E-mail: jrao@stanford.edu

Dr. P. Turunen
Zentrale Einrichtung für Mikroskopie
Institut für Molekulare Biologie (IMB)
Johannes Gutenberg-Universität
Ackermannweg 4, 55128 Mainz, Deutschland

Dr. H. R. A. Jonker
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz Zentrum (BMRZ)
Goethe Universität Frankfurt
60438 Frankfurt am Main, Deutschland

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

Einleitung

Metallionen sind unentbehrlich für zahlreiche zelluläre Funktionen, darunter Signaltransduktion, biochemische Reaktionen und Strukturgebung von Biomakromolekülen.^[1] Kupfer (Cu) ist ein redoxaktives Übergangsmetall, das als Enzym Cofaktor dient und Stoffwechselprozesse vermittelt, die für Zellwachstum und -entwicklung unerlässlich sind. Hierzu zählen unter anderem die antioxidative Abwehr,^[2] die aerobe Atmung,^[3] der Eisentransport^[4] und andere Prozesse wie die Pigmentsynthese.^[5] Die Verfügbarkeit von intrazellulären, ungebundenen Cu-Ionen wird streng kontrolliert, um oxidativen Stress, Lipidperoxidation und unspezifische Bindungen an intrazelluläre Biomoleküle zu verhindern.^[6,7] Daher wird die Konzentration freier Cu-Ionen im Zytoplasma extrem niedrig gehalten.^[8] Um die zelluläre Cu-Homöostase aufrechtzuerhalten, haben Zellen ausgeklügelte Transportwege aus Transportern, Liganden, Chaperonen und ihren jeweiligen Gegenspielern (Co-Chaperone) entwickelt.^[9,10]

Extrazelluläres Cu²⁺ wird in der Plasmamembran durch die sechs Transmembran-Epithelantigene der Prostata (STEAP)-Familie von Metalloreduktase-Proteinen zu Cu⁺ reduziert.^[11] Anschließend wird die zelluläre Aufnahme durch das hochaffine Cu⁺-Transmembran-Transporter-Protein Ctr1 (SLC31 A1) vermittelt.^[12] Die vorherrschende Oxidationsstufe von Kupfer in der Zelle ist aufgrund der reduzierenden zellulären Umgebung +1.^[13] Sobald Cu⁺ in die Zelle transportiert wurde, bindet zytosolisches Glutath-

ion (GSH) das freie Metallion und bildet einen Cu^+ -GSH-Komplex, um die Konzentration freier Cu^+ -Ionen zu minimieren und ein austauschbares Cu^+ -Reservoir zu schaffen.^[8] Der Cu^+ -GSH-Komplex überträgt Cu^+ an zytosolische Cu^+ -Chaperone, wie Antioxidatives Protein 1 (Atox1), Cyclooxygenase 17 (COX17) und Kupfer-Chaperon für Superoxiddismutase (CCS).^[14,15] Die Cu^+ -Transportwege in menschlichen Zellen zeigen eine hohe Chaperon-Protein-Spezifität entlang eines Affinitätsgradienten.^[16] Vereinfacht ausgedrückt, erfolgt der Cu^+ -Transfer von Atox1 zu den ATPase Cu^+ -Transportern Alpha/Beta (ATP7 A/7B) im trans-Golgi-Netzwerk, von COX17 zur mitochondrialen Synthese von Cytochromoxidase 1/2 (Sco1/2) oder Cytochrom C Oxidase (CCO), und von CCS zu Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) im Zytosol oder in der inneren Mitochondrienmembran (Abbildung 1A).^[17] Einige Chape-

rone (z. B. Atox1 und CCS) und Co-Chaperone (z. B. ATP7 A/7B) binden Cu^+ über die Cysteinseitenketten eines konservierten **MXCXXC**-Motivs (X ist eine beliebige Aminosäure), wobei der Cu^+ -Austausch über einen Thiolaustauschmechanismus erfolgt (Abbildung 1A).^[18] Auch Methionin wurde in Studien mit Modellpeptiden ebenfalls als wichtig für die zusätzliche Bindungsstabilität identifiziert.^[19]

Ungleichgewichte in der Cu^+ -Homöostase induzieren Anomalien, die bei der Pathogenese mehrerer Krankheiten, z. B. Krebs,^[20] Morbus Wilson (WD)^[21] und Menkes-Syndrom,^[22] eine Rolle spielen. Zum Beispiel ist Cu^+ an der Proliferation von Krebszellen, der Modulation des Immunsystems sowie der Tumorangio-genese und der Tumorentwicklung beteiligt,^[23] einschließlich bei Darmkrebs,^[24] Lungenkrebs,^[25] Brustkrebs,^[26] primären Hirntumoren,^[27] hepatozellulärem Karzinomen^[28] usw. Kürzlich wurde ein

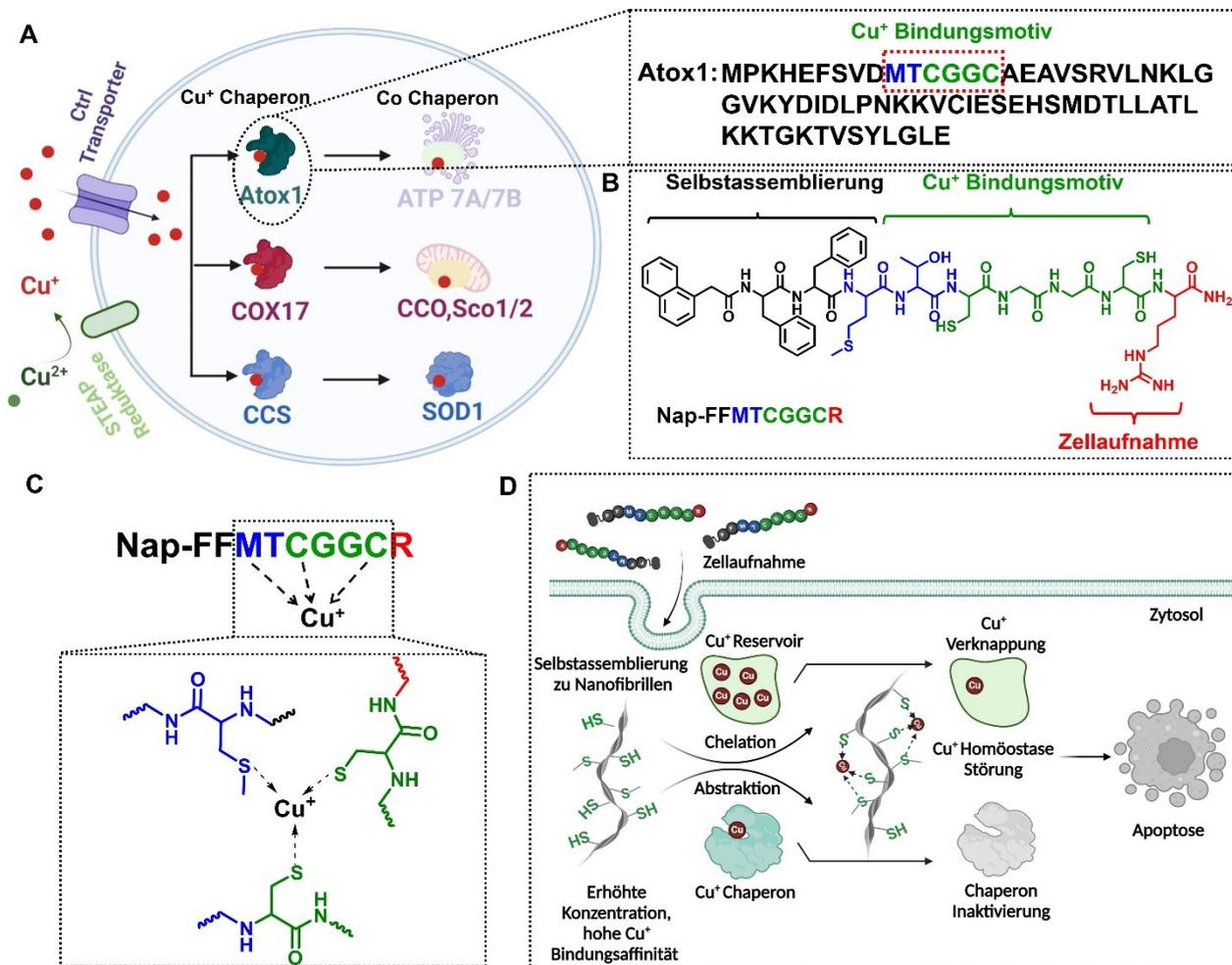


Abbildung 1. Schematische Darstellung von (A) Cu^+ -Aufnahme und -Transport in menschlichen Zellen. Die vollständige Sequenz des menschlichen Atox1, das MTCGGC als Cu^+ -bindendes Motiv enthält, ist dargestellt. (B) Chemische Struktur des vom Cu^+ -Chaperon abgeleiteten Peptids Nap-FFMTCGGCR, das aus MTCGGC als Cu^+ -Bindungsmotiv, Arginin (R) zur Verbesserung der zellulären Aufnahme und Nap-FF als selbstassemblierendes Motif besteht. (C) Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Koordinationsmodells der Bindung von Nap-FFMTCGGCR an Cu^+ . Nap-FFMTCGGCR bindet Cu^+ hauptsächlich über die Thiolgruppen der Cysteine im Verhältnis 1:1. Methionin (M) trägt zu dieser Koordination bei. (D) Nap-FFMTCGGCR assembliert zu Nanofibrillen nach der Aufnahme in MDA-MB-231-Brustkrebszellen und bietet mehrere Cu^+ -Bindungsmotive an der Oberfläche der Fibrillen. Die Cu^+ -Bindung stört den Cu^+ -Transport in Krebszellen. Nap-FFMTCGGCR-Fibrillen fangen Cu^+ -Ionen aus dem intrazellulären Reservoir oder von Cu^+ -Chaperonen ab, was vermutlich zu einem allgemeinen Mangel an Cu^+ -Bioverfügbarkeit führt, der oxidativen Stress, zelluläre Dysfunktionen und schließlich Apoptose auslöst.

neues Konzept namens "Cuproplasia" eingeführt, das als Cu-abhängiges Zellwachstum und -proliferation definiert wird und das pharmakologisch durch Cu-selektive Chelatoren oder durch Ionophore aktiviert werden kann, um als Ziel für die Krebstherapie zu dienen.^[29] Das Design neuer Moleküle, die in der Lage sind, intrazelluläres Cu⁺ zu chelatisieren, ist jedoch äußerst herausfordernd, da eine Cu⁺-Bindungsaffinität im femtomolaren Bereich erforderlich ist, um wirksam in die Chaperon-/Co-Chaperon-Cu⁺-Bindung einzugreifen.^[15]

Unter Verwendung des konservierten **MTCGGC**-Motivs des menschlichen Atox1-Cu⁺-Chaperons schlagen wir vor, dass eine Vielzahl der monomeren Untereinheiten, angeordnet in einem Superstruktur-Netzwerk, eine assemblierungsverstärkte Affinität für Cu⁺ aufweisen sollte (Abbildung 1A–B). Das menschliche Atox1 bindet Cu⁺ über die Cysteinreste des **MTCGGC**-Motivs und nimmt dabei ein zweifach koordiniertes S–Cu–S-Modell mit einem S–Cu-Abstand von 2.16 Å an.^[30] Daher haben wir das selbstassemblierende Peptid-Amphiphil **Nap-FFMTCGGCR** entworfen, das drei Motive umfasst: (1) die mit Naphthalin (**Nap**) endgruppenfunktionalisierte Diphenylalanin (**FF**)-Domäne, die die Selbstassemblierung bedingt, (2) die Sequenz **MTCGGC**, die Cu⁺ mit hoher Affinität und Selektivität für Cu⁺ gegenüber anderen Kationen bindet, und (3) der Arginin (**R**)-Rest, der die zelluläre Aufnahme verbessert. Wir nehmen an, dass **Nap-FFMTCGGCR** Cu⁺ hauptsächlich über die Cysteinreste bindet, wobei das Methionin im **MTCGGC**-Motiv eine unterstützende Rolle einnimmt (Abbildung 1C).^[19,31]

Nach der Zellaufnahme sorgt die lokale Anreicherung^[32] für eine Selbstassemblierung zu zytosolischen **Nap-FFMTCGGCR**-Fibrillen, die Cu⁺ binden und kompetitiv von intrazellulären Proteinen, Liganden oder Reservoiren übernehmen können, was zelluläre Dysfunktionen induziert, die zum Zelltod führen (Abbildung 1D). Kontrollpeptide, die nicht assemblieren können, unterstreichen die Bedeutung der Fibrillenbildung, um die gewünschte Funktion zu erreichen. Die Selektivität gegenüber Cu-sensitiven Krebszellen, wie den dreifach negativen Brustkrebszellen MDA-MB-231, wurde untersucht und im Vergleich zu normalen HEK-293T-Zellen betrachtet. Wir zeigen, dass *in situ* Assemblierungsstrategien als leistungsstarkes Werkzeug zur Verbesserung biochemischer Eigenschaften eingesetzt werden können. Bis heute wurden verschiedene, in Krebszellen überexprimierte intrazelluläre Komponenten, wie Rezeptoren, Enzyme usw., untersucht, um die *in situ* Selbstassemblierung amphiphiler Peptide in Krebszellen zu induzieren, was zu zellulären Dysfunktionen führt und letztendlich den Zelltod verursacht.^[33,34] Beispielsweise nutzten Liu *et al.* die Überexpression von GSH, um selbstsortierte Peptid-Assemblierungen in HeLa-Zellen zu erzeugen, die gleichzeitig das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat targetieren.^[35,36] Guo *et al.* zeigten, dass die Peptid-Protein-Assoziation in lebenden Zellen eine Nekroptose bei Darmkrebs auslöst.^[37] Hier präsentieren wir zum ersten Mal die Störung der intrazellulären Metallionen-Homöostase durch künstlich *in situ* generierte Selbstassemblierung, um Apoptose in dreifach negativen Brustkrebszellen auszulösen.

Ergebnisse und Diskussion

Design, Synthese und Cu⁺-Bindung von Nap-FFMTCGGCR

Abgeleitet von natürlichen Cu⁺-Chaperonen wurde die Sequenz **MTCGGC** so konzipiert, dass sie zwei Cysteinreste enthält, die durch zwei Glycinreste getrennt sind und für die Cu⁺-Bindung verantwortlich sind. Der *N*-Terminus von **MTCGGC** wurde mit einem hydrophoben naphthalinfunktionalisierten Diphenylalanin (**Nap-FF**) modifiziert, um die Selbstassemblierung zu Nanofibrillen durch π - π -Wechselwirkungen zu fördern. Der *C*-Terminus wurde mit Arginin (**R**) ergänzt, um die Interaktion mit der Zellmembran und die zelluläre Aufnahme zu erleichtern. Die Sequenz **FFMTCGGCR** wurde unter Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Festphasensynthese (SPPS) auf Rink-Amidharz synthetisiert. Naphthalin-Essigsäure wurde auf dem Festphasen-Support unter

Verwendung von 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU)/*N,N*-Diisopropyl-ethylamin (DIPEA) an den *N*-Terminus des Peptids gekoppelt (Abbildung S1). **Nap-FFMTCGGCR** wurde mit Trifluoressigsäure (TFA) vom Festphasenträger abgespalten und in Folge dessen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gereinigt und mittels Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) (Abbildung S2), ¹H NMR (Abbildung S3) und ¹H, ¹H-COSY NMR -Spektroskopie (Abbildung S4) charakterisiert.

Nap-FFMTCGGCR^{mn} (Der hochgestellte Index "mn" steht für die monomere Form des Peptids) kann in Lösungsmitteln wie DMSO, Methanol und einer Wasser/Acetonitril-Mischung gelöst werden. Seine kritische Aggregationskonzentration (CAC) in Milli-Q-Wasser beträgt 50 μ M, bestimmt mittels Nilrot-Assay (Abbildung S5). Da die vorherrschende Oxidationsstufe von Kupfer innerhalb der Zelle aufgrund der reduktiven intrazellulären Umgebung +1 ist,^[38] verwendeten wir während unserer Untersuchung Cu⁺ aus der Quelle Cu[(CH₃CN)₄]PF₆.^[39] Zunächst untersuchten wir die Cu⁺-Bindung von **Nap-FFMTCGGCR^{mn}** auf molekularer Ebene. **Nap-FFMTCGGCR^{mn}** absorbiert Licht bei 254–300 nm, wobei die Intensität mit zunehmender moläquivalenter Zugabe von Cu⁺ zunahm (Abbildung 2A). Der aus den UV/Vis-Spektren berechnete Cu⁺-gebundene Anteil von **Nap-FFMTCGGCR^{mn}** deutet auf eine ~1:1 stöchiometrische Bindung von **Nap-FFMTCGGCR^{mn}** an Cu⁺ hin (Tabelle S1). Die Molekularmassenanalyse mittels MALDI-TOF zeigte die jeweilige Molekularmasse bei 1248.4 (m/z) an, was der berechneten Masse des Cu⁺-gebundenen Peptids entspricht (Abbildung S6). Der Ellman-Reagenz-Assay (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), DTNB) wurde durchgeführt, um die Beteiligung der Sulfhydryl (–SH)-gruppen von **Nap-FFMTCGGCR^{mn}** an der Bindung von Cu⁺ zu untersuchen.^[40] DTNB reagiert mit freien -SH-Gruppen, um ein gemischtes Disulfid und 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) zu erzeugen. TNB absorbiert Licht bei 412 nm, was die quantitative Bestimmung freier -SH-Gruppen ermöglicht. Die stöchiometrische Zugabe von Cu⁺ zu **Nap-FFMTCGGCR^{mn}** führte zu einer Abnahme der freien -SH-Konzentration in **Nap-FFMTCGGCR^{mn}**, wobei eine Abnah-

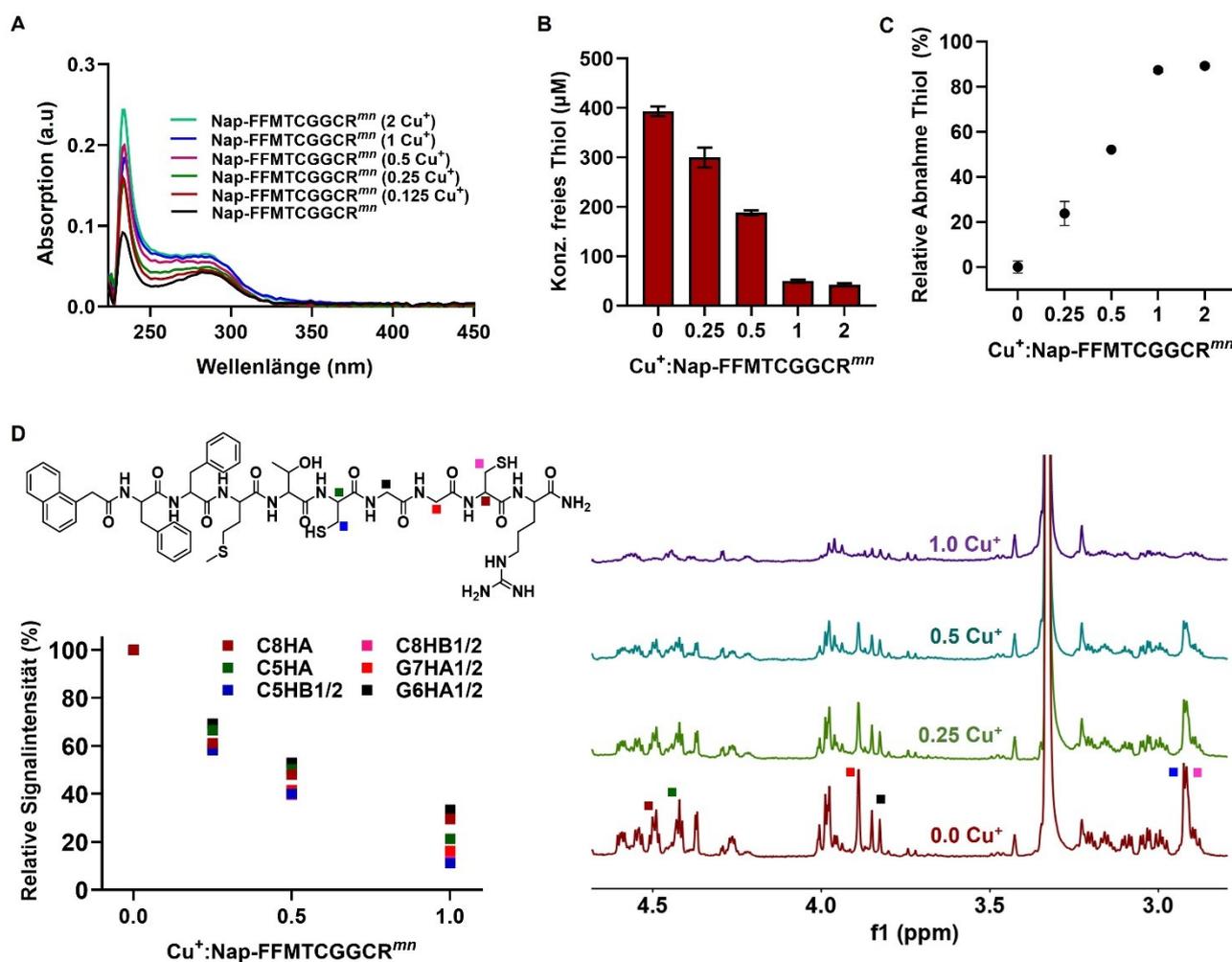


Abbildung 2. (A) UV/Vis-Spektren von Nap-FFMTCGGCR^{mn} (10 μM, Milli-Q-Wasser) nach Zugabe von Cu⁺ (0, 0.25, 0.5, 1 und 2 Moläquivalent). (B) Ellman-Reagenz-Assay, der die Abnahme der freien -SH-Konzentration nach der Zugabe von Cu⁺ (0, 0.25, 0.5, 1 und 2 Moläquivalent) zu Nap-FFMTCGGCR^{mn} (MeOH, 400 μM) zeigt. (C) Relative Abnahme der freien -SH-Konzentration, berechnet aus Abbildung B. (D) Relative Signalintensität, die nach der Zugabe von Cu⁺ (0, 0.25, 0.5 und 1 Moläquivalent) zu Nap-FFMTCGGCR^{mn} aus den ¹H NMR -Spektren (700 MHz, 298 K, MeOH-d₄) im Vergleich zu einem internen Standard (C₂H₂Cl₄) berechnet wurde. Entsprechende ¹H NMR -Spektren (vergrößerter Ausschnitt) und die relevanten Protonen werden gezeigt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt, n = 3 für B, C und D.

me von $23.8 \pm 5.3\%$, $52.1 \pm 1.4\%$, $87.3 \pm 0.89\%$ und $89.2 \pm 0.98\%$ bei der Zugabe von 0.25, 0.5, 1 und 2 Moläquivalenten Cu⁺ beobachtet wurde (Abbildung 2B–C, Abbildung S7). Diese Ergebnisse zeigen die Beteiligung der -SH-Funktionalgruppe an der Bindung von Cu⁺.

Als Nächstes analysierten wir die Cu⁺-Bindung von Nap-FFMTCGGCR^{mn} mittels ¹H NMR -Spektroskopie. Zunächst wurde die Struktur von Nap-FFMTCGGCR^{mn} mittels ¹H NMR in DMSO-d₆ als Lösungsmittel charakterisiert, wie in Abbildung S3 dargestellt. Anschließend wurde die Cu⁺-Bindung an Nap-FFMTCGGCR^{mn} durch ¹H NMR in MeOH-d₄ untersucht, um die Oxidation des Peptids durch das Lösungsmittel zu verhindern. Wir beobachteten einen fortschreitenden Verlust der ¹H NMR -Signalintensität bei der stöchiometrischen Zugabe von Cu⁺ zu Nap-FFMTCGGCR^{mn}, begleitet von einer Verbreiterung der Peaks, wie in Abbildung S8 dargestellt. Diese Beobachtung

unterstützt die Theorie einer Bindung von Cu⁺ an Nap-FFMTCGGCR^{mn}.^[41] Eine quantitative Analyse der NMR-Signalintensität in Bezug auf den internen Standard C₂H₂Cl₄ (bei 6.49 ppm) wurde durchgeführt, und die Ergebnisse sind in Abbildung S9 und Abbildung 2D zusammengefasst. Bei der Zugabe von 0.5 Moläquivalenten Cu⁺ nahm die Signalintensität der Protonen C5HA (4.43 ppm), C5HB1/2 (2.9 ppm), C8HA (4.49 ppm), C8HB1/2 (2.89 ppm), G6HA1/2 (3.84 ppm) und G7HA1/2 (3.9 ppm) von 100% ohne Cu⁺ auf $46.0 \pm 0.23\%$, $37.3 \pm 0.08\%$, $44.3 \pm 0.3\%$, $36.8 \pm 0.1\%$, $48.4 \pm 0.3\%$ und $38.3 \pm 0.2\%$ ab. Bei der Zugabe von einem Moläquivalent Cu⁺ nahm die Signalintensität der jeweiligen Protonen weiter ab auf $23.5 \pm 0.5\%$, $9.9 \pm 0.2\%$, $14.5 \pm 0.3\%$, $10.7 \pm 0.2\%$, $30.1 \pm 0.3\%$ und $11.3 \pm 0.3\%$. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass das CGGC-Motiv wahrscheinlich an der Bindung von Cu⁺ beteiligt ist. Insbesondere wurden die Signalintensitäten der

β -Protonen der Cystein-Reste nach der Zugabe von äquimolarem Cu^+ deutlich reduziert (Abbildung 2D), während die Signalintensitäten der aromatischen Protonen (z.B. F2HD1/2 bei 7.0 ppm, $39.4 \pm 0.2\%$) weniger betroffen waren (Abbildung S10). Darüber hinaus zeigten ihre Integrale keine offensichtlichen Veränderungen im Vergleich zur Referenz, was darauf hindeutet, dass innerhalb des getesteten Zeitraums von bis zu 24 Stunden keine Aggregation auftrat (Abbildung S11). Aus diesen Beobachtungen postulieren wir, dass die Cu^+ -Bindung an **Nap-FFMTCGGCR^{nm}** zu einer eingeschränkten Mobilität von **Nap-FFMTCGGCR^{nm}** führen sollte, was zu einem Verlust von ^1H NMR -Signalintensität führt. Weiterhin zeigten die EPR-Spektren kein Signal, das Cu^{2+} entspricht, was auf die Stabilität von Cu^+ nach der Bindung an **Nap-FFMTCGGCR^{nm}** innerhalb von 24 Stunden hindeutet (Abbildung S12). Das **Nap-FFMTCGGCR^{nm}**-Peptid zeigte eine hohe Spezifität gegenüber Cu^+ und keine offensichtliche Reaktion auf andere physiologisch relevante Metallionen wie K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} und Mg^{2+} , außer gegenüber Cu^{2+} (Abbildung S14).

Nap-FFMTCGGCR^{ag} bindet Cu^+ effizient

Als Nächstes untersuchten wir die Cu^+ -Bindung an **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** (das hochgestellte "ag" bezieht sich auf Peptide in ihrem aggregierten Zustand) oberhalb der CAC von $50 \mu\text{M}$ in Milli-Q-Wasser. Die CAC blieb nach der Zugabe von Cu^+ (1 mol. Äquivalent) unverändert, wie in Abbildung S15 gezeigt. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und die Rasterkraftmikroskopie (AFM) im intermittierenden Modus zeigten, dass sich **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** zu geordneten Nanofibrillen selbstassemblierte (Abbildung S15). Der Durchmesser der Nanofibrillen, gemessen anhand der TEM-Bilder, betrug $9.1 \pm 0.3 \text{ nm}$, und die AFM-Bilder zeigten eine Höhe von $6.2 \pm 0.5 \text{ nm}$. Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) bestätigte die Fibrillenbildung von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** weiter, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $9 \pm 0.3 \text{ nm}$ und mehreren Mikrometern Länge (Abbildung 3A, Abbildung S16). Der Durchmesser stieg nach der Bindung an Cu^+ leicht auf $9.9 \pm 0.3 \text{ nm}$ an (Abbildung 3C, Abbildung S17). Die UV/Vis-Spektren zeigten eine Zunahme der Absorption bei 254–300 nm nach der Bindung an Cu^+ (Abbildung S20). Die Sekundärstruktur von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** wurde mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht. Die Spektren zeigten einen starken negativen Cotton-Effekt bei 233 nm, einen positiven Cotton-Effekt bei 212 nm und einen negativen Cotton-Effekt bei 203 nm, was auf die Anwesenheit von Kation- π -Wechselwirkungen, β -Faltblatt-Strukturen und α -Helix-Konformationen hinweist, die nach der Bindung an äquimolares Cu^+ beibehalten wurden (Abbildung 3E). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich die Morphologie der **Nap-FFMTCGGCR^{ag}**-Nanofibrillen nach der Bindung an Cu^+ nicht veränderte.^[42,43] Der Ellman-Reagenz-Assay zeigte eine 80%ige Abnahme der freien Thiolgruppen von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** nach der Bindung von 1 mol. Äquivalent Cu^+ (Abbildung 3F, Abbil-

dung S21). Die Oberflächenladungsverteilung von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** zeigte ein durchschnittliches Zeta-Potential von $46 \pm 2.2 \text{ mV}$ ($100 \mu\text{M}$), das nach der Cu^+ -Bindung (1:1) unverändert blieb ($46.9 \pm 2 \text{ mV}$, Abbildung S22). Ein Bindungsstöchiometrieverhältnis von 1:1 zwischen **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** und Cu^+ wurde in einem Titrationsexperiment mit dem bekannten Cu^+ -Chelator Bicinchoninat (Bca) beobachtet (Abbildung S23).^[44] Bca bindet Cu^+ mit einem 2:1 (Bca: Cu^+)-Stöchiometrieverhältnis und bildet einen rosafarbenen Komplex $[\text{Cu}^+(\text{Bca})_2]^{3-}$ aus, der Licht bei 562 nm absorbiert. Die Titration von Cu^+ (0 – $160 \mu\text{M}$) und $100 \mu\text{M}$ Bca zeigte einen linearen Anstieg der Absorption bei 562 nm, der bei der Zugabe von ~ 0.5 Äquivalent ($50 \mu\text{M}$) Cu^+ ein Maximum erreichte, was der Bildung von $[\text{Cu}^+(\text{Bca})_2]^{3-}$ entspricht. Allerdings zeigte die vergleichbare Titration von Cu^+ in eine Lösung aus Bca ($100 \mu\text{M}$) und **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** ($100 \mu\text{M}$) einen verzögerten Anstieg der Absorption bei 562 nm und benötigte die Zugabe von $\sim 140 \mu\text{M}$ Cu^+ , um das Plateau zu erreichen (Abbildung 3G). Die Titrationskurve zeigt, dass **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** Cu^+ mit einem Stöchiometrieverhältnis von nahezu 1:1 bindet. Darüber hinaus weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** Cu^+ auch in Anwesenheit von Bca bindet. Bca bindet Cu^+ mit einer hohen Dissoziationskonstante von $10^{-17.3} \text{ M}$, wie zuvor berichtet,^[44,45] was uns ermöglichte, die Dissoziationskonstante von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** mit gebundenem Cu^+ in einem kompetitiven Bindungstitrationsexperiment mit Bca abzuschätzen. Eine sehr niedrige K_D von $(2.3 \pm 1.6) \times 10^{-14.3} \text{ M}$ ^[44] wurde für **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** mit Cu^+ beobachtet (Tabelle S2), was etwa 100-fach niedriger ist als der K_D von Cu^+ -**Nap-FFMTCGGCR^{nm}**. Der K_D des Cu^+ -**Nap-FFMTCGGCR^{nm}** Komplexes beträgt etwa $(3.03 \pm 1.27) \times 10^{-12.3} \text{ M}$ (Tabelle S3).

Als Nächstes untersuchten wir die Wirkung von Glutathion (GSH) auf die Cu^+ -Bindungsfähigkeit und Selbstassemblierung von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}**. Die Cu^+ -Bindungstitration (0 – $160 \mu\text{M}$) gegen Bca in Anwesenheit von GSH ($100 \mu\text{M}$) veränderte die Titrationskurve nicht bedeutend, was darauf hindeutet, dass GSH bei dieser Konzentration kein Kompetitor von Bca für Cu^+ ist. Allerdings zeigte eine vergleichbare Titration von Cu^+ in eine Lösung, die Bca ($100 \mu\text{M}$), GSH ($100 \mu\text{M}$) und **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** ($100 \mu\text{M}$) enthielt, einen verzögerten Anstieg der Absorption bei 562 nm, wobei $\sim 140 \mu\text{M}$ Cu^+ erforderlich waren, um das Plateau zu erreichen (Abbildung S24A). Dies deutet darauf hin, dass die 1:1 stöchiometrische Bindung von **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** an Cu^+ in Anwesenheit von GSH erhalten bleibt. Wir untersuchten ferner, ob Fibrillen in Anwesenheit von intrazellulär relevanten Konzentrationen von GSH (0.1 bis 5 mM) gebildet werden können (Abbildung S24B). TEM-Bilder des in Milli-Q-Wasser hergestellten **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** in Anwesenheit von GSH zeigten das Vorhandensein von Fibrillen. Zusätzlich zeigte das vorassemblierte **Nap-FFMTCGGCR^{ag}** eine hohe Stabilität, wenn es mit unterschiedlichen Konzentrationen von GSH inkubiert wurde. Dies wurde durch die TEM-Bilder und die Analyse der Zählrate (kcps) bestätigt, die über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden unverändert blieb (Abbildung S24C–D).

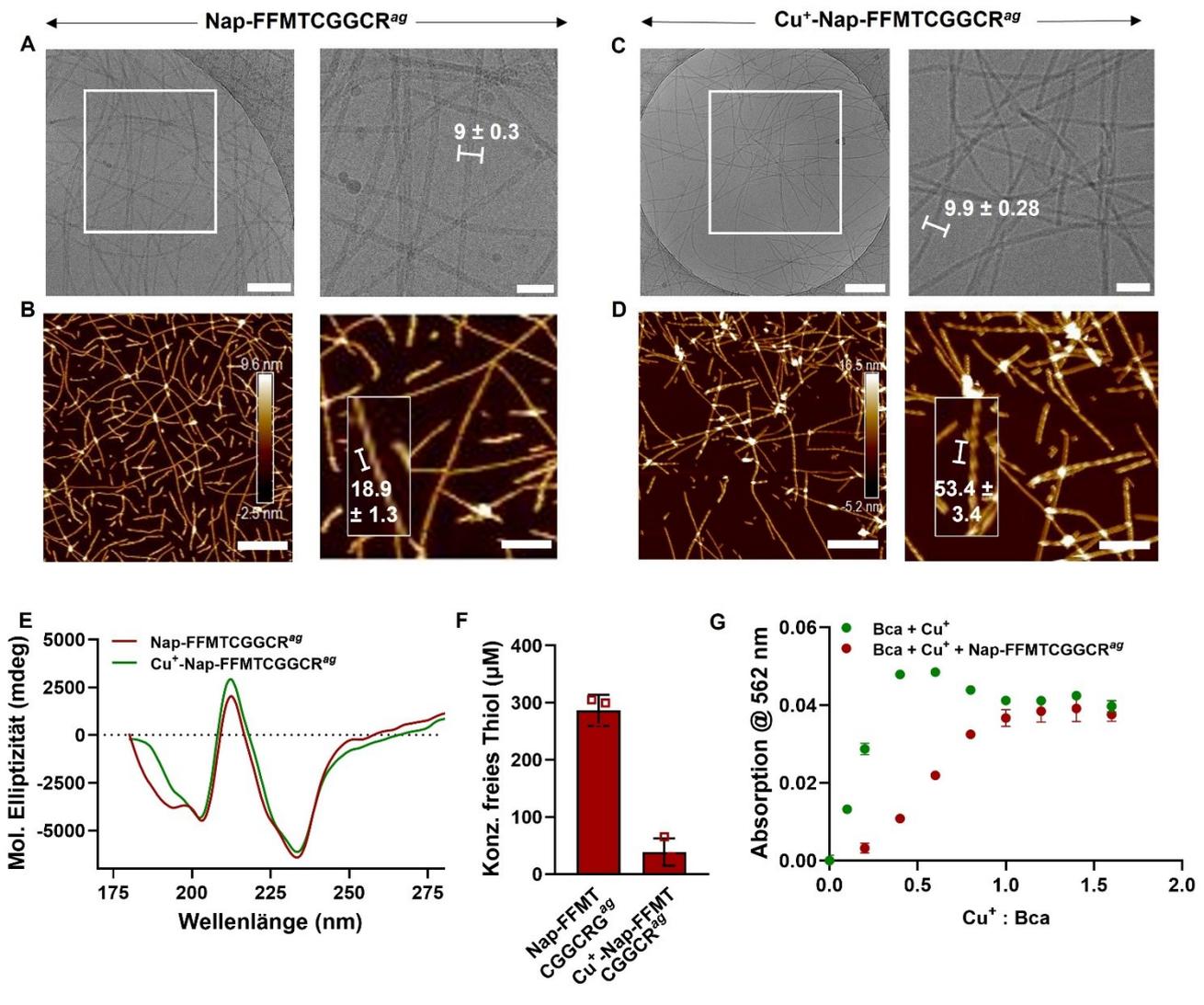


Abbildung 3. Die Mikroskopiebilder von (A) Nap-FFMTCGGCR^{ag} (100 μ M, Milli-Q) beobachtet unter Cryo-EM (Skala: 200 nm bzw. 50 nm) und (B) Liquid Tapping AFM (Skala: 270 nm bzw. 100 nm). Die Mikroskopiebilder von Cu⁺-Nap-FFMTCGGCR^{ag} (100 μ M, Milli-Q) beobachtet unter (C) Cryo-EM (Skala: 200 nm bzw. 50 nm) und (D) Liquid Tapping AFM (Skala: 600 nm bzw. 280 nm). (E) CD-Spektren von Nap-FFMTCGGCR^{ag} (100 μ M) und Cu⁺-Nap-FFMTCGGCR^{ag} (1 : 1, 100 μ M). (F) Der Ellman-Reagenz-Assay zeigt eine 80%ige Reduktion der Oberflächen-Thiole von Nap-FFMTCGGCR^{ag} (100 μ M) nach Zugabe von 1 Moläquivalent Cu⁺. (G) Die Bindungstitrationskurve von Nap-FFMTCGGCR^{ag} (100 μ M) und Bca (100 μ M) gegenüber Cu⁺ (0–160 μ M). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, $n=3$. Der Durchmesser der einzelnen Fibrillen wurde aus den TEM-Bildern mit der Bildverarbeitungssoftware Image J ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, $n=100$. Die helikale Länge wurde aus AFM-Bildern mit der Datenverarbeitungssoftware NanoScope Analysis ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, $n=5$.

Intrazelluläre Selbstassemblierung von Nap-FFMTCGGCR

Triple-negative MDA-MB-231-Brustkrebszellen haben einen hohen Bedarf an Cu⁺ im Vergleich zu gesunden Zellen. Um die Internalisierung und intrazelluläre Selbstassemblierung von **Nap-FFMTCGGCR** in MDA-MB-231-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu visualisieren, wurde das fluoreszierende Peptidderivat **NBD-FFMTCGGCR** synthetisiert, indem Naphthalin durch 4-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol (NBD) ersetzt wurde. Der NBD-Fluorophor wurde bereits zuvor für die Bildgebung in zellulär selbstassemblierenden Nanofibrillen verwendet. **NBD-FFMTCGGCR** und **Nap-**

FFMTCGGCR coassemblieren zu Nanofibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 12.5 ± 0.7 nm. Diese coassemblierten Fibrillen absorbieren Licht bei 400–500 nm und emittieren bei 500–700 nm, was sie für die Visualisierung unter konfokaler Mikroskopie geeignet macht. Hierbei gilt zu beachten, dass **NBD-FFMTCGGCR** bei 100 μ M keine Nanofibrillen ausbildet. Die MDA-MB-231-Zellen wurden mit einer Mischung aus **NBD-FFMTCGGCR** und **Nap-FFMTCGGCR** (jeweils 5 μ M, insgesamt 10 μ M) inkubiert, die in den Zellen Coaggregate bildet, und nach 24 Stunden durch konfokale Mikroskopie visualisiert. Eine helle grüne Fluoreszenz zeigte die zelluläre Internalisierung

und die intrazelluläre Nanofibrillenbildung von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** durch Coassemblierung an. Im Gegensatz dazu bildete **NBD-FFMTCGGCR** (10 μM) wahrscheinlich aufgrund der erhöhten CAC im Vergleich zu **Nap-FFMTCGGCR** keine Aggregate in den Zellen.

Die CAC von **NBD-FFMTCGGCR** wurde mit dem Nilrot-Assay auf 105 μM bestimmt, während die CAC von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** bei 68.7 μM lag. Die niedrigere CAC von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** wurde der höheren Selbstassemblierungstendenz von **Nap-FFMTCGGCR** (CAC: 50 μM) im Vergleich zu **NBD-FFMTCGGCR** zugeschrieben. **NBD-FFMTCGGCR** zeigte die Bildung von Fibrillen (durchschnittlicher Durchmesser war 11.9 ± 0.3 nm), als es bei 200 μM (Milli-Q-Wasser) analysiert wurde. Die Analyse der Fluoreszenz-Emissionsspektren sowohl von **NBD-FFMTCGGCR** als auch von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenz-Emission. Ein Diagramm von $\text{Log}[c]$ versus I_{max} (maximale Emissionsintensität) bei 546 nm zeigte einen langsamen Anstieg unterhalb der CAC und einen exponentiellen Anstieg überhalb der CAC in beiden Fällen.

Dies deutet darauf hin, dass die Selbstassemblierung die Emission von **NBD-FFMTCGGCR** verstärkt. Daher deutet die beobachtete Fluoreszenz aus der Zelle nach der Inkubation mit **Nap/NBD-FFMTCGGCR** auf die Bildung von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** innerhalb der Zelle hin, die durch Coinkubation erreicht werden kann. Eine quantitative Analyse ergab eine zelluläre Aufnahme von 0.192 ± 0.003 , 0.206 ± 0.006 und 0.253 ± 0.006 μM von **NBD-FFMTCGGCR** (pro 500 k Zellen) bei Inkubation mit 5, 10 und 20 μM von **Nap/NBD-FFMTCGGCR**, was auf eine konzentrationsabhängige Aufnahme von **NBD-FFMTCGGCR** in Krebszellen hinweist.

Als Nächstes wurde holotomographische Mikroskopie angewendet, um die unmarkierte Assemblierung von **Nap-FFMTCGGCR** innerhalb der Zelle zu untersuchen. Bei der holotomographischen Mikroskopie werden die Brechungsindizes der zellulären Kompartimente gemessen, um daraus ein Holotogramm zu erstellen. Die assemblierten Peptide weisen Brechungsindizes (~ 1.35 – 1.36) auf, die durch Holotographie messbar sind. Zunächst wurde das Holotogramm von unbehandelten MDA-MB-231-Zellen aufgenommen, wie in Abbildung 4D gezeigt. Die Brechungsindizes der zellulären Komponenten wie Nukleoli, Lipidtröpfchen und Mitochondrien wurden ungefähr mit 1.349 ± 0.0043 , 1.366 ± 0.0016 und 1.342 ± 0.0014 gemessen (in DMEM-Medium). Die Inkubation von MDA-MB-231-Zellen mit **Nap-FFMTCGGCR** (10 oder 20 μM) zeigte die Anwesenheit von Aggregaten innerhalb der Zelle mit einem Brechungsindex von 1.357 ± 0.004 (Abbildung 4E, Abbildung S31), der visuell von Lipidtröpfchen unterscheidbar ist.

Um **Nap-FFMTCGGCR** von Lipidtröpfchen innerhalb der Zelle mithilfe von Fluoreszenz zu unterscheiden, wurden **Nap/NBD-FFMTCGGCR** in den Zellen coassembliert. **NBD-FFMTCGGCR** (10 μM) selbst bildet keine Aggregate in Zellen. Daher wurden unter Holotographie keine Fluoreszenzsignale beobachtet, wie in Abbildung S32A dargestellt, was mit den Konfokalmikroskopiebildern übereinstimmt. Nach der Inkubation von **Nap/NBD-FFMTCGGCR**

(10 μM) wurden jedoch intrazelluläre Aggregate durch ihre grüne Fluoreszenz nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die Coinkubation zur Bildung von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** innerhalb der Zelle führt (Abbildung S32B). Bemerkenswerterweise assembliert 10 μM **Nap/NBD-FFMTCGGCR** in zellfreien Tests nicht zu Nanofibrillen, was die Bedeutung der intrazellulären Anreicherung beider Peptide unterstreicht, um bei einer Konzentration von 10 μM Strukturen innerhalb der Zelle auszubilden (Abbildung S33). Wir haben die Segmentierung von **Nap/NBD-FFMTCGGCR** und Lipidtröpfchen durchgeführt, wie in Abbildung 4F gezeigt. Die Lipidtröpfchen waren in den unbehandelten Kontrollzellen sowie in den mit **NBD-FFMTCGGCR** und **Nap/NBD-FFMTCGGCR** behandelten Zellen vorhanden, während Peptidaggregate nur in den mit **Nap/NBD-FFMTCGGCR** behandelten Zellen vorhanden waren (Abbildung 4F, Abbildung S34). Die Lipidtröpfchen und Aggregate zeigten keine Colokalisierung (Abbildung S35). Um zu überprüfen, ob die coassemblierte Struktur in einem bestimmten subzellulären Kompartiment lokalisiert war, wurde eine Analyse der zellulären Colokalisierung durchgeführt. MDA-MB-231-Zellen wurden 12 Stunden mit **Nap/NBD-FFMTCGGCR** (10 μM) inkubiert, bevor sie durch konfokale Mikroskopie bildlich erfasst wurden. Es wurde weder eine Colokalisierung mit Mitochondrien (MitoTrackerTM Red FM) noch mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER-TrackerTM Red) festgestellt. Eine teilweise Colokalisierung mit Endo-Lysosomen (LysoTrackerTM Red) (Pearson-Koeffizient 0.31) deutet darauf hin, dass die Peptide wahrscheinlich über Endozytose internalisiert werden (Abbildung S36–S38).

Nap-FFMTCGGCR induziert Apoptose von Krebszellen

Aufgrund des erhöhten Bedarfs an Cu^+ -Metabolismus für das Wachstum und die Proliferation von Brustkrebszellen nahmen wir an, dass die intrazelluläre Cu^+ -Bindung von **Nap-FFMTCGGCR** negative Auswirkungen auf diese Zellen haben könnte.^[50,51] Um Einblick in diese Spekulation zu erhalten, untersuchten wir zunächst die Überlebensrate von MDA-MB-231 Brustkrebszellen, nachdem wir sie zeitabhängig mit **Nap-FFMTCGGCR** behandelt hatten. MDA-MB-231-Zellen wurden mit 10 μM **Nap-FFMTCGGCR** inkubiert, um das Überleben der Zellen über die Zeit zu analysieren. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit **Nap-FFMTCGGCR** wurden 78.8 ± 8.8 % lebensfähige Zellen detektiert. Nach 48 und 72 Stunden sank die Überlebensrate der Zellen weiter auf 39.2 ± 4.5 % bzw. 14.2 ± 2.9 %, was darauf hindeutet, dass die Behandlung mit **Nap-FFMTCGGCR** die Lebensfähigkeit der MDA-MB-231 Brustkrebszellen über die Zeit effektiv reduzierte (Abbildung 5A).

Die beobachtete Reduktion der Zellebensfähigkeit könnte entweder von den in der Zelle gebildeten **Nap-FFMTCGGCR** stammen oder von einem synergistischen Effekt, der sowohl aus der Aggregation als auch aus der Störung der Cu^+ -Homöostase resultiert. Daher wurde das Kontrollpeptid **Nap-FFMTGGR** synthetisiert, das ebenfalls

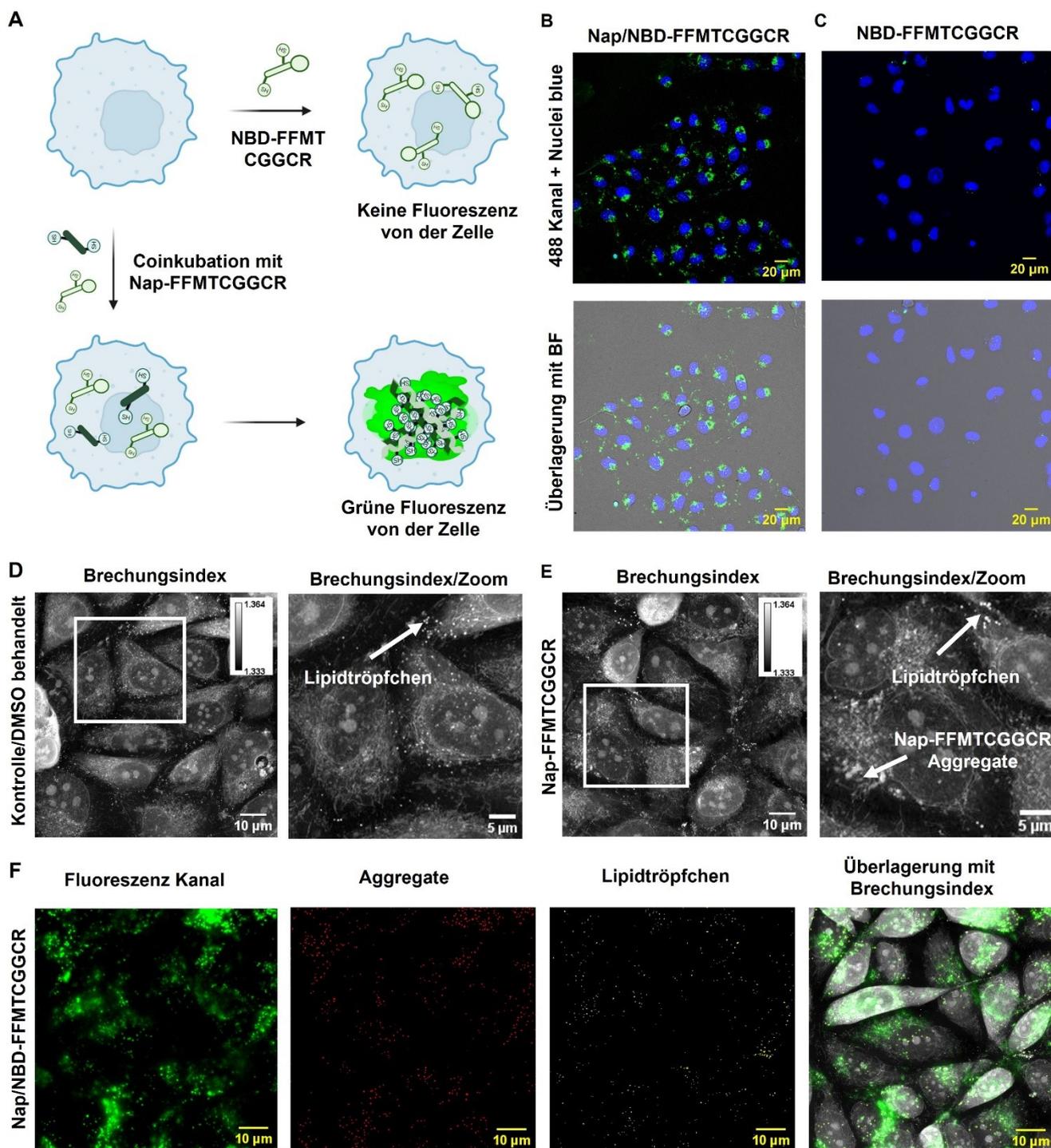


Abbildung 4. (A) Schematische Darstellung des Coassemblierungsansatzes zur Untersuchung der Selbstassemblierung von Nap-FFMTCGGCR innerhalb der Zelle. Konfokalmikroskopie-Bilder von MDA-MB-231-Zellen, die mit (B) NBD/Nap-FFMTCGGCR (10 μ M) und (C) NBD-FFMTCGGCR (10 μ M) nach 24 Stunden Inkubation behandelt wurden. Die Zellkerne wurden mit NucBlue™ gefärbt. Hologramm von (D) Kontroll-MDA-MB-231-Zellen (behandelt mit DMSO). Die Kalibrierungsleiste zeigt den Brechungsindex (RI) an. Die Lipidtröpfchen sind mit Pfeilen markiert, und (E) MDA-MB-231-Zellen, die mit Nap-FFMTCGGCR behandelt wurden, zeigen nach 24 Stunden die Anwesenheit von Aggregaten mit einem RI von $\sim 1,357 \pm 0,004$. (F) Das segmentierte Hologramm von MDA-MB-231-Zellen, die mit Nap/NBD-FFMTCGGCR behandelt wurden, zeigt das Auftreten von grüner Fluoreszenz, die aus der Aggregation resultiert. Die gelben Punkte zeigen Lipidtröpfchen an und die roten Punkte zeigen Aggregate, die nach der Behandlung mit Nap/NBD-FFMTCGGCR innerhalb der Zelle gebildet wurden. Die Segmentierung wurde mit einer auf Random Forest basierenden Pixelklassifizierung durchgeführt.

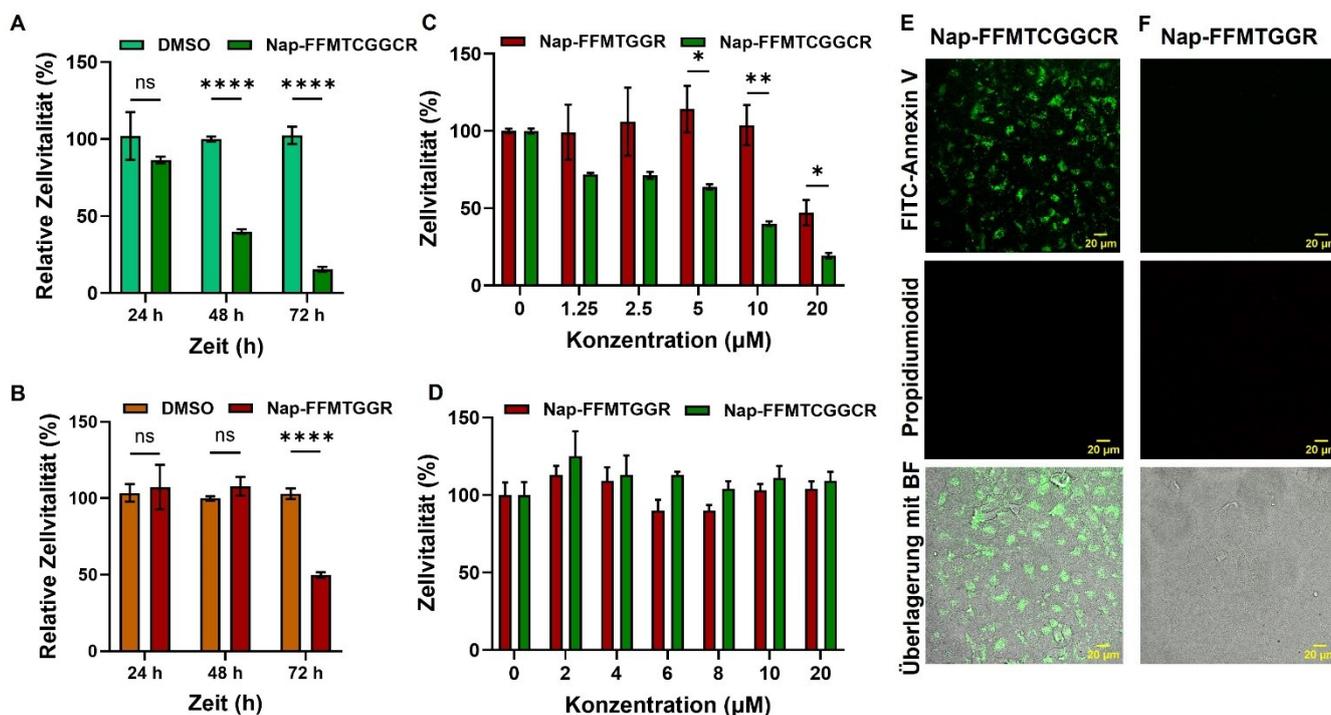


Abbildung 5. Die Reaktion von MDA-MB-231-Zellen auf die Behandlung mit (A) Nap-FFMTCGGCR (10 μM) und (B) Nap-FFMTGGR (10 μM) über die Zeit. Konzentrationsabhängige Analyse der Zellviabilität von Nap-FFMTCGGCR und Nap-FFMTGGR gegenüber (C) MDA-MB-231-Zellen und (D) HEK 293T-Zellen, die nach 48 h analysiert wurden. Live/Dead-Zellassay durchgeführt mit FITC-Annexin V/Propidiumiodid-Färbung nach Behandlung mit (E) Nap-FFMTCGGCR (10 μM , 48 h) und (F) Nap-FFMTGGR (10 μM , 48 h). Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des unpaired t-Tests, korrigiert nach der Bonferroni-Dunn-Methode, durchgeführt, wobei der P-Wert-Schwellenwert 0.05 beträgt: 0.1234 (ns), *P < 0.0332, **P < 0.0021, ***P < 0.0002, ****P < 0.0001). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (s.d.) dargestellt, $n=3$.

selbstassembliert (CAC: 45 μM in Milli-Q-Wasser), jedoch aufgrund des Fehlens der Cystein-Reste nicht an Cu^+ binden kann (Abbildung S40–41). Zunächst wurde die Fibrillenbildung von Nap-FFMTGGR^{ag} außerhalb der Zellen analysiert, wobei Fibrillen mit einem Durchmesser von 5.9 ± 0.3 nm erhalten wurden (Abbildung S42). Als Nächstes wurde der Einfluss der intrazellulären Aggregation von Nap-FFMTGGR (10 μM Inkubation) auf die Zelllebensfähigkeit getestet. Die Zellen blieben jedoch auch nach 48 Stunden vital. Erst nach 72 Stunden sank die Zelllebensfähigkeit auf 55.7 ± 2.9 % (Abbildung 5B). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Peptidaggregate, die kein Cu^+ -Bindungsmotiv aufweisen, eine längere Inkubationszeit benötigen, um zytotoxische Effekte auf die MDA-MB-231-Zellen auszulösen. Eine konzentrationsabhängige Analyse der Zelllebensfähigkeit sowohl von Nap-FFMTCGGCR als auch von Nap-FFMTGGR in MDA-MB-231-Zellen (48 h Inkubation) zeigte, dass Nap-FFMTCGGCR eine Zytotoxizität mit einem IC_{50} von 6.5 μM induzierte, während Nap-FFMTGGR einen ungefähr dreifach höheren IC_{50} von 19.9 μM zeigte (Abbildung 5C). Interessanterweise zeigten beide Verbindungen unter den getesteten Bedingungen (48 h, bis zu 20 μM) keine Zytotoxizität in normalen HEK 293T-Zellen, was auf eine ausgeprägte Zytotoxizität in Krebs- im Vergleich zu gesunden Zellen hinweist (Abbildung 5D).

Die ausbleibende Toxizität von Nap-FFMTCGGCR in HEK 293T-Zellen unter den getesteten Bedingungen wurde hauptsächlich einer geringeren (~ 1.4 -fachen) zellulären Aufnahme von Nap-FFMTCGGCR in HEK 293T-Zellen im Vergleich zu MDA-MB-231-Zellen zugeschrieben, was wahrscheinlich auf die höhere negative Oberflächenladung der Krebszellen zurückzuführen ist (Abbildung S43–44).^[52] Der Apoptose-Assay (unter Verwendung von FITC-Annexin V und Propidiumiodid (PI)) zeigte eine Annexin-V-Färbung an der Plasmamembran der mit Nap-FFMTCGGCR behandelten MDA-MB-231-Zellen, was darauf hindeutet, dass die Zellen nach 48 Stunden (10 μM) Inkubation frühe apoptotische Wege einleiteten (Abbildung 5E). Hier zeigt das Fehlen eines PI-Signals an, dass der Zelltod hauptsächlich durch Apoptose verursacht wurde. Im Gegensatz dazu induzierte Nap-FFMTGGR unter diesen Bedingungen (48 h, 10 μM) keine Apoptose (Abbildung 5F).

Nap-FFMTCGGCR stört die Cu^+ -Homöostase und induziert oxidativen Stress in Krebszellen

Als Nächstes untersuchten wir die zugrunde liegenden Mechanismen, die zur Zelltoxizität nach der Behandlung mit Nap-FFMTCGGCR führen. Wir gehen davon aus, dass die hohe Affinität von Nap-FFMTCGGCR^{ag} gegenüber Cu^+ es eventuell ermöglicht, erfolgreich mit zytosolischen Cu^+

-Chaperonen oder intrazellulären Cu^+ -Komplexen zu konkurrieren. Die Cu^+ -Homöostase steht in engem Zusammenhang mit dem Redox-Gleichgewicht der Zelle, da SOD1, das Schlüsselenzym für das Redox-Gleichgewicht, Cu^+ als Cofaktor nutzt.^[53] SOD1 ist ein antioxidatives Enzym, das das Superoxidanion durch Umwandlung des freien Radikals in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid überführt.^[54,55] Wir postulieren, dass die Cu^+ -Bindungsfähigkeit von **Nap-FFMTCGGCR**^{ag} einen Cu^+ -Mangel im SOD1-Enzym verursachen könnte, was zu einem Redox-Ungleichgewicht in der Zelle führt. Zunächst untersuchten wir, ob die SOD1-Aktivität der Zellen nach der Behandlung mit **Nap-FFMTCGGCR** beeinträchtigt war. Die zelluläre SOD1-Aktivität der unbehandelten Kontrollgruppe wurde mit 0.404 ± 0.01 U/mL gemessen. Nach 48-stündiger Behandlung mit **Nap-FFMTCGGCR** ($20 \mu\text{M}$) wurde eine achtfache Re-

duktion der Aktivität auf 0.05 ± 0.003 U/mL beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit **Nap-FFMTGGR** keine Veränderungen (0.43 ± 0.02 U/mL) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 6A, Abbildung S45). Wir vermuten, dass **Nap-FFMTCGGCR**^{ag}, das in der Zelle gebildet wird, möglicherweise mit dem CCS-Chaperon interagiert und dadurch den Cu^+ -Transport an SOD1 unterbricht. SOD1 ist der Gegenspieler des CCS-Chaperons. Da Cu^+ als Cofaktor für die ordnungsgemäße Funktion von SOD1 dient, führt ein Mangel an Cu^+ wahrscheinlich zu einem Verlust der SOD1-Aktivität.

Anschließend untersuchten wir, ob die reduzierte SOD1-Aktivität zu einem erhöhten zellulären oxidativen Stress führt, indem wir einen Assay auf Basis von 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFDA) einsetzten. DCFDA ist ein zellpermeabler fluorogener Farbstoff, der die Aktivität reakti-

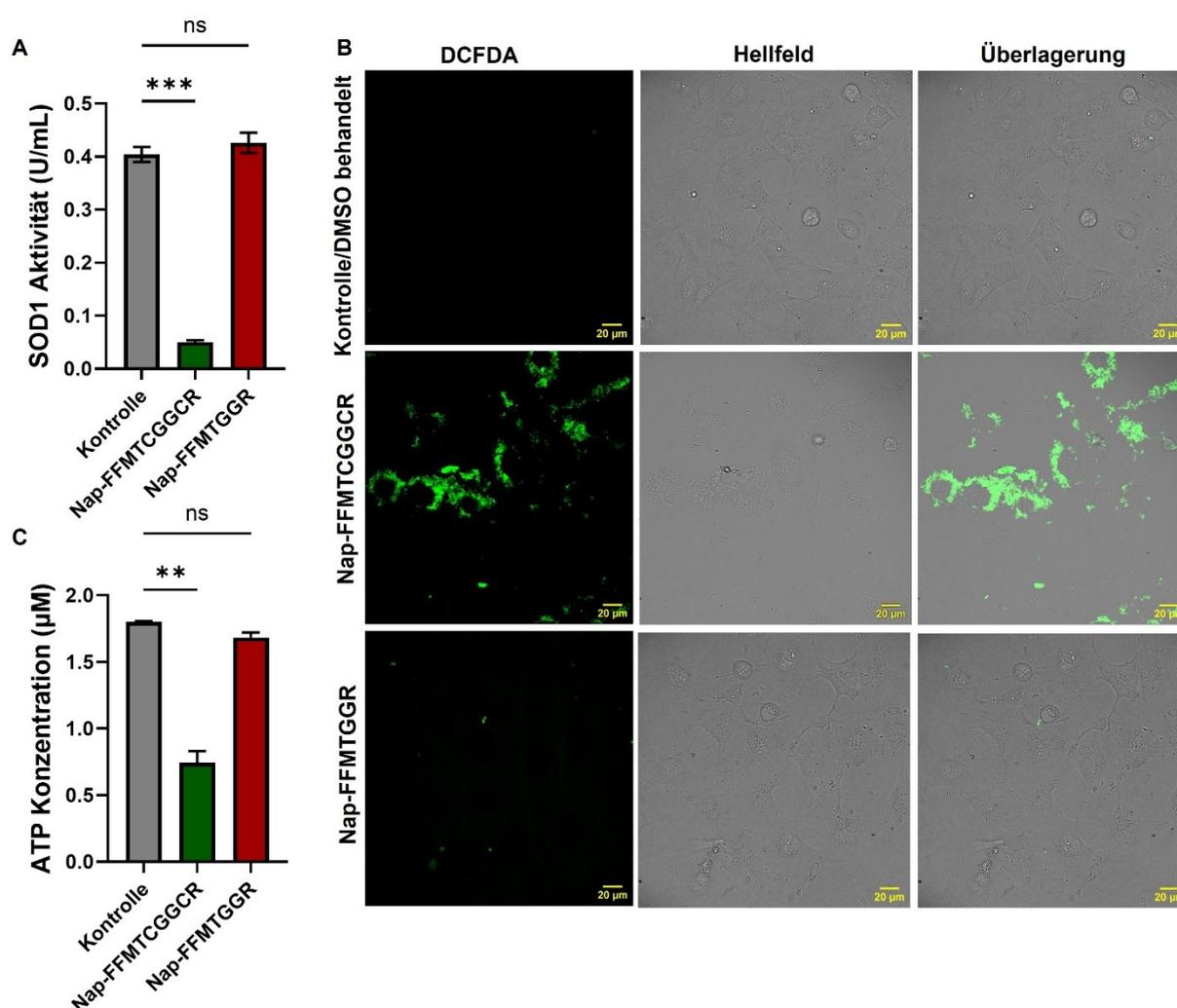


Abbildung 6. (A) SOD1-Analyse der MDA-MB-231-Zellen nach der Behandlung mit Nap-FFMTCGGCR oder Nap-FFMTGGR ($20 \mu\text{M}$, 48 h). (B) ROS-Generierung innerhalb der MDA-MB-231-Zellen, gemessen mit der DCFDA-Sonde nach der Behandlung mit Nap-FFMTCGGCR oder Nap-FFMTGGR ($20 \mu\text{M}$, 48 h). (C) ATP-Konzentration der MDA-MB-231-Zellen nach der Behandlung mit Nap-FFMTCGGCR oder Nap-FFMTGGR ($20 \mu\text{M}$, 48 h). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus drei replizierten Messungen dar. Die statistische Analyse wurde mit einer one-way ANOVA (korrigiert nach der Bonferroni-Methode) durchgeführt. P-Werte: 0.12 (ns), 0.033 (*), 0.002 (**), < 0.001 (***). Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, $n = 3$.

ver Sauerstoffspezies (ROS), wie Hydroxyl-, Peroxyl- und Singulett-Sauerstoff in der Zelle, misst. MDA-MB-231-Zellen wurden für 48 Stunden mit 20 μM **Nap-FFMTCGGCR** oder **Nap-FFMTGGR** behandelt. Nach der Analyse durch konfokale Mikroskopie nach Färbung mit DCFDA wurde eine starke Fluoreszenz von den mit **Nap-FFMTCGGCR** behandelten Zellen beobachtet (Abbildung 6B). Dagegen zeigten die mit **Nap-FFMTGGR** behandelten Zellen unter den getesteten Bedingungen (20 μM , 48 h) keine Fluoreszenz. Diese Beobachtung wurde durch die Durchflusszytometrie weiter bestätigt (Abbildung S46). Wir gehen davon aus, dass der erhöhte zelluläre oxidative Stress zu metabolischen Defekten in den Zellen führen kann. Um zu untersuchen, ob die intrazelluläre Aggregation und die damit verbundene Cu^+ -Bindung von **Nap-FFMTCGGCR**^{ag} zu Stoffwechseldefekten führen, bewerteten wir die zellulären ATP-Werte nach der Behandlung mit **Nap-FFMTCGGCR** oder **Nap-FFMTGGR**. Die ATP-Konzentration der unbehandelten Kontrollgruppe von MDA-MB-231-Zellen wurde mit $1.8 \pm 0.006 \mu\text{M}$ gemessen. Wie erwartet, reduzierte die Behandlung mit **Nap-FFMTCGGCR** (20 μM , 48 h) den ATP-Spiegel auf $0.74 \pm 0.09 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu zeigte die **Nap-FFMTGGR**-behandelte Gruppe keine deutliche Veränderung ($1.68 \pm 0.04 \mu\text{M}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe unter ähnlichen Bedingungen (Abbildung 6C, Abbildung S47).

Die Fibrillenstruktur ist entscheidend für die Störung der intrazellulären Cu^+ Homöostase

Um den Einfluss der Fibrillenstruktur auf die Störung der intrazellulären Cu^+ -Homöostase zu untersuchen, führten wir Experimente mit dem Kontrollpeptid **Nap-MTCGGCR** durch (Abbildung S48). **Nap-MTCGGCR** enthält eine Cu^+ -bindende Domäne, jedoch kein Strukturelement, das die Selbstassemblierung unterstützt (**Nap-FF**). Die Cu^+ -Bindung von **Nap-MTCGGCR** wurde durch UV/Vis-Spektroskopie bestätigt, wobei eine Zunahme der Absorption bei 254–300 nm nach der Bindung an Cu^+ festgestellt wurde (Abbildung 7A). **Nap-MTCGGCR** zeigte in der TEM-Analyse bei einer Konzentration von 100 μM keine selbstassemblierten Strukturen (Abbildung 7B, Abbildung S49). Auch die Analyse der Zytotoxizität an MDA-MB-231-Zellen zeigte über 72 Stunden bei einer Konzentration von 100 μM keine nachteiligen Effekte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die bloße Anwesenheit der Cu^+ -bindenden Domäne auf molekularer Ebene allein nicht ausreicht, um die Cu^+ -Homöostase im zellulären Umfeld zu stören. Unterstützend dazu zeigte der Annexin V/PI-Färbetest nach der Behandlung mit **Nap-MTCGGCR** (20 μM , 46 h) keine positive Färbung für Annexin V oder PI, was darauf hinweist, dass **Nap-MTCGGCR** den Zelltod in MDA-MB-231-Zellen nicht auslöste (Abbildung S50). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der intrazellulären Selbstassemblierung für eine effektive Cu^+ -Bindung und Störung der zellulären Cu^+ -Homöostase.

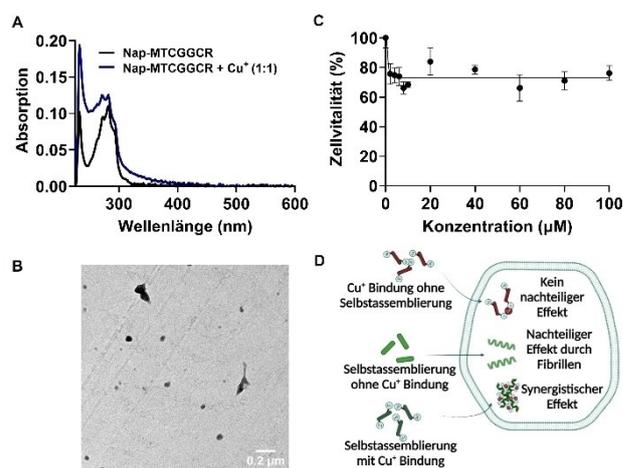


Abbildung 7. (A) Die UV/Vis-Spektren von Nap-MTCGGCR (40 μM , Milli-Q) in Reaktion auf die Zugabe von Cu^+ (1 molare Äquivalente). (B) TEM-Bild von Nap-MTCGGCR (100 μM), das keine Nanostrukturbildung zeigt. (C) Analyse der Zellviabilität von Nap-MTCGGCR gegenüber MDA-MB-231-Zellen, getestet über 72 h. (D) Schematische Darstellung des Verhaltens von Nap-MTCGGCR, Nap-FFMTGGR und Nap-FFMTCGGCR innerhalb einer Krebszelle. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (s.d.) dargestellt, $n = 3$ für C.

Zusammenfassung

Während das gezielte Beeinflussen der Cu^+ -Homöostase einen vielversprechenden Ansatz für Krebstherapien darstellt, war der Fortschritt in diesem Bereich bisher durch unzureichende Effekte kleiner Moleküle auf die Cu^+ -Homöostase begrenzt. Basierend auf natürlichen Cu^+ -Chaperonen haben wir das Cu^+ -bindende Motiv durch supramolekulare Konzepte verstärkt, um eine hohe lokale Konzentration von Cu^+ -bindenden Domänen auf selbstassemblierten Nanostrukturen innerhalb von Zellen zu erreichen. Diese **Nap-FFMTCGGCR**^{ag}-Strukturen konkurrieren erfolgreich mit den natürlichen Cu^+ -Bindungssystemen in dreifach negativen Brustkrebszellen (MDA-MB-231), was die Limitationen von kleinen Molekülen bei der Störung der Cu^+ -Homöostase überwindet. Wir konnten die zellulären Reaktionen aufgrund der Cu^+ -Bindung von denen der Fibrillenbildung unterscheiden. Hierfür wurde das Kontrollpeptid **Nap-FFMTGGR**, das selbstassembliert, aber kein Cu^+ bindet untersucht. Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass die bloße Existenz eines Cu^+ -bindenden Motivs nicht ausreicht, um die Cu^+ -Homöostase in der Zelle zu stören, wie die Analyse des nicht assemblierenden Kontrollpeptids **Nap-MTCGGCR** belegt. Wir zeigen, dass die Kombination molekularer Funktionen mit *in situ* Selbstassemblierungstechnologien eine attraktive Strategie ist, um deren Bioaktivität in lebenden Zellen zu verstärken.

Unterstützende Information

Die Autoren haben zusätzliche Referenzen in den unterstützenden Informationen zitiert.^[44,56-61]

Danksagung

J.M.T. wird von der Alexander von Humboldt-Stiftung unterstützt. Wir danken der IMB Flow Cytometry und Microscopy Core Facility für ihre Unterstützung. Die Finanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützte das BD LSRFortessa SORP (P#210253511, IMB Flow Cytometry Core Facility). I.H. dankt für die finanzielle Unterstützung durch das H2020 Marie Curie Actions Fellowship der Europäischen Kommission (ITN SUPERCOL, Fördervereinbarung 860914). J.M.T., L.C. und J.R. danken für die Unterstützung durch den NCI (R01CA243033). Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

Stichwörter: Cu⁺ Homöostase Störung · Intrazelluläre Selbstassemblierung · Oxidativer Stress · Krebstherapie

- [1] Y. Liu, Y. Wang, S. Song, H. Zhang, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 12234–12247.
- [2] M. Drażkiewicz, E. Skórzyńska-Polit, Z. Krupa, *BioMetals* **2004**, *17*, 379–387.
- [3] L. M. Ruiz, A. Libedinsky, A. A. Elorza, *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 711227.
- [4] A. Dancis, D. S. Yuan, D. Haile, C. Askwith, D. Eide, C. Moehle, J. Kaplan, R. D. Klausner, *Cell* **1994**, *76*, 393–402.
- [5] J. Wang, C. Luo, C. Shan, Q. You, J. Lu, S. Elf, Y. Zhou, Y. Wen, J. L. Vinkenborg, J. Fan, H. Kang, R. Lin, D. Han, Y. Xie, J. Karpus, S. Chen, S. Ouyang, C. Luan, N. Zhang, H. Ding, M. Merckx, H. Liu, J. Chen, H. Jiang, C. He, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 968–979.
- [6] A. Gupte, R. J. Mumper, *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 32–46.
- [7] X. Chen, Q. Cai, R. Liang, D. Zhang, X. Liu, M. Zhang, Y. Xiong, M. Xu, Q. Liu, P. Li, P. Yu, A. Shi, *Cell Death Dis.* **2023**, *14*:105, 1–12.
- [8] V. C. Shanbhag, N. Gudekar, K. Jasmer, C. Papageorgiou, K. Singh, M. J. Petris, *Biochim. Biophys. Acta.* **2021**, *1868*, 118893.
- [9] P. Lelièvre, L. Sancey, J. L. Coll, A. Deniaud, B. Busser, *Cancers* **2020**, *12*, 1–25.
- [10] B. E. Kim, T. Nevitt, D. J. Thiele, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 176–185.
- [11] W. J. Chen, H. T. Wu, C. L. Li, Y. K. Lin, Z. X. Fang, W. T. Lin, J. Liu, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 752426.
- [12] J. F. Eisses, J. H. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37159–37168.
- [13] M. L. Turski, D. J. Thiele, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 717–72.
- [14] G. F. Chen, V. Sudhakar, S. W. Youn, A. Das, J. Cho, T. Kamiya, N. Urao, R. D. McKinney, B. Surenkhuu, T. Hamakubo, H. Iwanari, S. Li, J. W. Christman, S. Shantikumar, G. D. Angelini, C. Emanuelli, M. U. Fukai, T. Fukai, *Sci. Rep.* **2025**, *5*, 14780.
- [15] L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, T. Kozyreva, K. Zovo, P. Palumaa, *Nature* **2010**, *465*, 645–648.
- [16] A. Lasorsa, M. I. Nardella, A. Rosato, V. Mirabelli, R. Calianandro, R. Calianandro, G. Natile, F. Arnesano, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 12109–12120.
- [17] S. C. Dodani, S. C. Leary, P. A. Cobine, D. R. Winge, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8606–8616.
- [18] Y. Hatori, S. Inouye, R. Akagi, *IUBMB Life* **2017**, *69*(4), 246–254.
- [19] J. T. Rubino, M. P. Chenkin, M. Keller, P. Riggs-Gelasco, K. J. Franz, *Metallomics* **2011**, *3*, 61–73.
- [20] A. Gupte, R. J. Mumper, *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 32–46.
- [21] G. M. Yang, L. Xu, R. M. Wang, X. Tao, Z. W. Zheng, S. Chang, D. Ma, C. Zhao, Y. Dong, S. Wu, J. Guo, Z. Y. Wu, *Cell Rep.* **2023**, *42*, 112417.
- [22] E. D. Harris, M. C. M. Reddy, S. Majumdar, M. Cantera, *BioMetals* **2003**, *16*, 55–61.
- [23] S. Baldari, G. D. Rocco, G. Toietta, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1069.
- [24] S. K. Gupta, V. K. Shukla, M. P. Vaidya, S. K. Roy, S. Gupta, *J. Surg. Oncol.* **1993**, *52*, 172–175.
- [25] X. Zhang, Q. Yang, *Int. J. Med. Res.* **2018**, *46*, 4863–4873.
- [26] J. T. Dabek, M. Harkonen, H. Adlercreutz, M. Hyvönen-Dabek, *Nutr. Cancer* **1992**, *17*, 195–201.
- [27] L. Turecký, P. Kalina, E. Uhlíková, Š. Námerová, J. Křížko, *Klin. Wochenschr.* **1984**, *62*, 187–189.
- [28] A. P. Fang, P. Y. Chen, X. Y. Wang, Z. Y. Liu, D. M. Zhang, Y. Luo, G. C. Liao, J. A. Long, R. H. Zhong, Z. G. Zhou, Y. J. Xu, X. J. Xu, W. H. Ling, M. S. Chen, Y. J. Zhang, H. L. Zhu, *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 2823–2832.
- [29] E. J. Ge, A. I. Bush, A. Casini, P. A. Cobine, J. R. Cross, G. M. DeNicola, Q. P. Dou, K. J. Kranz, V. M. Gohil, S. Gupta, S. G. Kaler, S. Lutsenko, V. Mittal, M. J. Petris, R. Polishchuk, M. Ralle, M. L. Schilsky, N. K. Tonks, L. T. Vahdat, L. V. Aelst, D. Xi, P. Yuan, D. C. Brady, C. J. Chang, *Nat. Rev. Cancer* **2022**, *22*, 102–113.
- [30] A. K. Boal, A. C. Rosenzweig, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4760–4779.
- [31] P. Rousselot-Pailley, O. Sénèque, C. Lebrun, S. Crouzy, D. Boturyn, P. Dumy, M. Ferrand, P. Delangle, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 5510–5520.
- [32] Z. Feng, H. Wang, F. Wang, Y. Oh, C. Berciu, Q. Cui, E. H. Egelman, B. Xu, *Cell Rep. Phys. Sci.* **2020**, *1*, 100085.
- [33] H. Wang, Z. Feng, B. Xu *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2421.
- [34] W. Tan, Q. Zhang, J. Wang, M. Yi, Hongjian He, B. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12796–12801
- [35] X. Liu, M. Li, J. Liu, Y. Song, B. Hu, C. Wu, A. A. Liu, H. Zhou, J. Long, L. Shi, Z. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 9312–9323.
- [36] X. Liu, F. Tian, Z. Zhang, J. Liu, S. Wang, R. C. Guo, B. Hu, H. Wang, H. Zhu, A. A. Liu, L. Shi, Z. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146*, 24177–24187.
- [37] R. C. Guo, N. Wang, W. Wang, Z. Zhang, W. Luo, Y. Wang, H. Du, Y. Xu, G. Li, Z. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202314578.
- [38] K. M. Davies, J. F. B. Mercer, N. Chen, K. L. Double, *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 565–574.
- [39] L. Cui, A. M. Gouw, E. L. LaGory, S. Guo, N. Attarwala, Y. Tang, J. Qi, Y. S. Chen, Z. Gao, K. M. Casey, A. A. Bazhin, M. Chen, L. Hu, J. Xie, M. Fang, C. Zhang, Q. Zhu, Z. Wang, A. J. Giaccia, S. S. Gambhir, W. Zhu, D. W. Felsher, M. D. Pegram, E. A. Goun, A. Le, J. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 357–367.

- [40] P. Roth, R. Meyer, I. Harley, K. Landfester, I. Lieberwirth, M. Wagner, D. Y. W. Ng, T. Weil, *Nat. Synth* **2023**, *2*, 980–988.
- [41] A. Rigo, A. Corazza, M. L. Paolo, M. Rossetto, R. Ugolini, M. Scarpa, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1495–1501.
- [42] R. C. Hider, G. Kupryszewski, P. Rekowski, B. Lammek, *Biophys. Chem.* **1988**, *31*, 45–51.
- [43] V. Joshi, T. Shivach, N. Yadav, A. S. Rathore, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 11606–11613.
- [44] Z. Xiao, J. Brose, S. Schimo, S. M. Ackland, S. L. Fontaine, A. G. Wedd, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 11047–11055.
- [45] J. Bros, S. L. Fontaine, A. G. Wedd, Z. Xiao, *Metallomics* **2014**, *6*, 793–808.
- [46] O. Karginova, C. M. Weekley, A. Raoul, A. Alsayed, T. Wu, S. S. Y. Lee, C. He, O. I. Olopade, *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18* (5), 873–885.
- [47] D. Ramchandani, M. Berisa, D. A. Tavarez, Z. Li, M. Miele, Y. Bai, S. B. Lee, Y. Ban, N. Dephoure, R. C. Hendrickson, S. M. Cloonan, D. Gao, J. R. Cross, L. T. Vahdat, V. Mittal, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7311.
- [48] Y. Gao, J. Shi, D. Yuan, B. Xu, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1033.
- [49] M. T. Jeena, L. Palanikumar, E. M. Go, I. Kim, M. G. Kang, S. Lee, S. Park, H. Choi, C. Kim, S. M. Jin, S. C. Bae, H. W. Rhee, E. Lee, S. K. Kwak, J. H. Ryu, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 26.
- [50] S. Blockhuys, P. Wittung-Stafshede, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 871.
- [51] Y. Liu, J. Wang, M. Jiang, *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1145080.
- [52] B. Chen, W. Le, Y. Wang, Z. Li, D. Wang, L. Ren, L. Lin, S. Cui, J. J. Hu, Y. Hu, P. Yang, R. C. Ewing, D. Shi, Z. Cui, *Theranostics* **2016**, *6*, 1887–1898.
- [53] E. C. A. Eleutherio, R. S. S. Magalhães, A. A. Brasil, J. R. M. Neto, L. H. Paranhos, *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, *697*, 108701.
- [54] P. C. Wong, D. Waggoner, J. R. Subramaniam, L. Tessarollo, T. B. Bartnikas, V. C. Culotta, D. L. Price, J. Rothstein, J. D. Gitlin, *PNAS* **2000**, *97*, 2886–2891.
- [55] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nature* **1983**, *306*, 284–287.
- [56] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55.
- [57] S. Berg, D. Kutra, T. Kroeger, C. N. Straehle, B. X. Kausler, C. Haubold, M. Schiegg, J. Ales, T. Beier, M. Rudy, K. Eren, J. I. Cervantes, B. Xu, F. Beuttenmueller, A. Wolny, C. Zhang, U. Koethe, F. A. Hamprecht, A. Kreshuk, *Nat. Methods* **2019**, *16*, 1226–1232.
- [58] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [59] Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, C. Depeursinge, *Nat. Photonics* **2013**, *7*, 113–117.
- [60] J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 1–23.
- [61] F. Cramer, G. E. Shephard, P. J. Heron, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5444.

Manuskript erhalten: 3. Juli 2024

Akzeptierte Fassung online: 24. Oktober 2024

Endgültige Fassung online: 18. November 2024