

Medizinische Chemie

Identifizierung eines Moleküls, das den Abbau der aktivierten Checkpoint-Kinase-1 auslöst und Charakterisierung der nicht-katalytischen Funktionen von Checkpoint-Kinase-1 in Tumorzellen

Ramy Ashry⁺, Mohamed Abdelsalam⁺, Julia Hausen, Christoph Hieber, Yanira Zeyn, Anne-Christin Sarnow, Matthias Schmidt, Sara Najafi, Ina Oehme, Matthias Bros, Jia-Xuan Chen, Mario Dejung, Wolfgang Sippl,* und Oliver H. Krämer*

Zusammenfassung: Das Protein Checkpoint-Kinase-1 (CHK1) steuert die Replikationsgeschwindigkeit und die Reparatur der DNA. Tumorzellen sind in ihrem Wachstum von CHK1 abhängig, dessen hohe Expression mit einer schlechteren Prognose von an Tumoren erkrankten Menschen assoziiert ist. Wir entdeckten ein Molekül, dass die Proteolyse von CHK1 auslösen kann (sogenanntes PROTAC für CHK1). Dieses PROTAC MA203 besteht aus dem Typ-I-Kinaseinhibitor Rabusertib, der bevorzugt aktiviertes CHK1 hemmt, sowie dem Cereblon-Liganden Pomalidomid. MA203 beschleunigt den von dem Strukturprotein Cereblon (CRBN) abhängigen Abbau von CHK1 über den zellulären Proteasomen-Komplex. Dies gilt für von soliden Tumoren isolierte Zellen und für akute Leukämiezellen. Durch Chemotherapie induzierter DNA-Replikationsstress und die damit einhergehende Aktivierung von CHK1 fördern diesen Prozess, der DNA-Schäden auslöst und Tumorzellen dem programmierten Zelltod (Apoptose) zuführt. Biochemische und zelluläre Bindungsstudien bestätigen die Potenz und Selektivität von MA203. Gesunde, reife und junge hämatopoetische Zellen, Stromazellen und Retina-Epithelzellen werden jedoch nicht von MA203 geschädigt. MA203 ist seinem korrespondierenden Inhibitor hinsichtlich DNA-Schädigung, Regulation von Apoptose-regulierenden BCL2-Proteinen und der Induktion von Apoptose in Tumorzellen überlegen. Diese Prozesse können unabhängig vom tumorsuppressiven Transkriptionsfaktor p53 erfolgen. Die Eliminierung des CHK1-Proteins als Strukturelement -nicht jedoch seine Hemmung- löst eine proteasomale Degradation von DNA-Replikationsproteinen und DNA-Reparaturproteinen aus. Ein genetisch vermitteltes Ausschalten von CHK1 bestätigt, dass diese neu identifizierten Funktionen von CHK1 über seine bekannte katalytische Aktivität hinausgehen. Somit lassen sich neue Funktionen von CHK1 als Strukturelement der transformierten Zelle durch innovative pharmakologische Ansätze ausnutzen.

[*] R. Ashry⁺, J. Hausen, Prof. Dr. O. H. Krämer
Institut für Toxikologie, Universitätsmedizin Mainz, 55131 Mainz,
Deutschland
E-mail: okraemer@uni-mainz.de

R. Ashry⁺
Abteilung für Oralpathologie, Zahnmedizinische Fakultät, Mansoura
University, 35516 Mansoura, Ägypten

Dr. M. Abdelsalam⁺, A.-C. Sarnow, Dr. M. Schmidt, Prof. Dr. W. Sippl
Institut für Pharmazeutische Chemie, Pharmazie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale),
Deutschland
E-mail: wolfgang.sippl@pharmazie.uni-halle.de

Dr. M. Abdelsalam⁺
Abteilung für Pharmazeutische Chemie, Fakultät für Pharmazie,
Alexandria University, Alexandria 21521, Ägypten

C. Hieber, Dr. Y. Zeyn, Dr. M. Bros
Klinik für Dermatologie, Universitätsmedizin Mainz, 55131 Mainz,
Deutschland

Dr. S. Najafi, Prof. Dr. I. Oehme
Hopp-Kindertumorzentrum Heidelberg (KiTZ), 69120 Heidelberg,
Deutschland

Dr. S. Najafi, Prof. Dr. I. Oehme
Klinische Kooperationseinheit Pädiatrische Onkologie (B310),
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) und Deutsches
Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), 69120
Heidelberg, Deutschland

Dr. S. Najafi, Prof. Dr. I. Oehme
Nationales Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg, 69120
Heidelberg, Deutschland

Dr. J.-X. Chen, Dr. M. Dejung
Institut für Molekularbiologie, 55128 Mainz, Deutschland

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

Additional supporting information can be found online in the
Supporting Information section

© 2025 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von
Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den
Bedingungen der [Creative Commons Attribution License](#), die jede
Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der
ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Einleitung

Chemotherapeutische Wirkstoffe induzieren DNA-Replikationsstress und DNA-Schäden. Sowohl exogen induzierte als auch endogene DNA-Replikationsprobleme und DNA-Schäden aktivieren sogenannte Checkpoint-Kinasen, welche den Zellzyklus verlangsamen und die DNA-Reparatur einleiten.^[1,2] Die Checkpoint-Kinasen ATM und CHK2 werden in Zellen mit DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) aktiviert. DNA-Replikationsstress, verursacht durch verlangsamte oder blockierte Replikationsgabeln und Einzelstrangbrüche, aktiviert ATR und CHK1. Die DNA-abhängige Proteinkinase DNA-PKcs ist eine weitere Checkpoint-Kinase, die DNA-Stress unmittelbar erkennt.^[1]

Proteolyse-induzierende Chimären (PROTACs) haben sich in den vergangenen Jahren als hochinnovative und vielversprechende Strategie für die Entwicklung zukünftiger Therapeutika etabliert.^[3,4] PROTACs für Kinasen setzen sich aus hochspezifischen Liganden zusammen, die an die katalytische Tasche der Zielproteine binden, aus Liganden für E3-Ubiquitin-Ligasen (beispielsweise Cereblon, CRBN, oder von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor, VHL) sowie aus Verbindungselementen für diese Komponenten. PROTACs vermitteln den Abbau ihrer Zielproteine über einen ternären Komplex mit einer E3-Ligase. Dies führt zur Poly-Ubiquitinierung und damit zum proteasomalen Abbau der entsprechenden Kinasen. Im Vergleich zu klassischen niedermolekularen Inhibitoren bieten PROTACs oft Vorteile. Diese sind erhöhte Wirksamkeit, rascher und anhaltender Abbau der Zielproteine sowie eine gesteigerte Selektivität in Zellen.^[5,6] Derzeit befinden sich achtzehn PROTACs in klinischen Studien zur Tumorthherapie.^[7] PROTACs stellen somit wertvolle Instrumente für mechanistische und biologische Analysen dar und eröffnen zugleich neue therapeutische Perspektiven.

CHK1 spielt eine Schlüsselrolle in der Zellzykluskontrolle. Es reguliert den Übergang von der G1- in die S-Phase sowie von der G2- in die M-Phase, die DNA-Replikation während der S-Phase und die DNA-Reparatur nach endogenen wie exogenen Schäden. CHK1 phosphoryliert und inaktiviert die Phosphatasen CDC25A/C, welche die cyclinabhängigen Kinasen (CDKs) aktivieren. Dadurch wird die Aktivität der CDK2/Cyclin-A- und CDK1/Cyclin-B-Komplexe vermindert, was zu einem Anhalten der Zellen in den G1/S- bzw. G2/M-Phasen führt. Zusätzlich aktiviert CHK1 die Kinasen WEE1/MYT1, welche CDK1 hemmen und so den G2/M-Übergang und die Zellzyklusprogression bei DNA-Schäden blockieren.^[8,9] Darüber hinaus regulieren die durch ATR-CHK1 induzierten Enzyme DNA2 und SMARCA1 gestoppte Replikationsgabeln, indem sie deren Regression und MUS81-vermittelte Spaltung beeinflussen.^[10]

Obwohl CHK1 eine zentrale Funktion einnimmt und Replikations- wie Reparaturprozesse in schnell proliferierenden Tumorzellen häufig gestört sind,^[1] konnte das therapeutische Potenzial bisheriger CHK1-Inhibitoren nicht realisiert werden. Toxizität, ungünstige pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften sowie unspezifische Effekte tragen zu deren eingeschränkter klinischer Wirksamkeit bei.^[11,12] Mausmodelle mit konstitutiver oder konditionaler Deletion von CHK1 im hämatopoetischen

System verdeutlichen dessen Bedeutung für die fötale und adulte Hämatopoese. Mäuse mit heterozygoter Deletion des CHK1 zeigen hingegen über mindestens ein Jahr keinen auffälligen Phänotyp und keine Anämie.^[9] Zudem bewirkt der CHK1-Inhibitor GDC-0575 in Kombination mit dem Nukleosidanalogon Cytarabin und dem Zytokin G-CSF, welches hämatopoetische Stammzellen mobilisiert, eine signifikante Wirksamkeit gegen AML-Zellen in vivo.^[13] Ein optimaler CHK1-Inhibitor sollte daher spezifisch das aktivierte CHK1 in mit Chemotherapeutika behandelten Tumorzellen angreifen, während inaktives CHK1 unbeeinträchtigt bleibt, um ein therapeutisches Fenster ohne akute Toxizität für normale Zellen zu eröffnen.

Da Checkpoint-Kinasen sowohl katalytische als auch (kaum definierte) nicht-katalytische Funktionen haben, könnte das bisherige Ausbleiben klinischer Erfolge auch auf strukturelle Aktivitäten von CHK1 zurückzuführen sein, die mit klassischen Inhibitoren nicht erfasst werden.^[1,2,11] Mausmodelle untermauern solche nicht-enzymatischen Funktionen im Rahmen der DNA-Schadensantwort und bei zellulärem Stress.^[2] CHK1 stabilisiert beispielsweise DNA-Replikationsgabeln durch -bislang unvollständig charakterisierte molekulare Mechanismen – unabhängig von seiner Kinaseaktivität.^[1,2] Ob diese strukturellen Funktionen therapeutisch nutzbar sind und ob CHK1 direkt die Mengen an DNA-Replikations- und Reparaturproteinen reguliert, ist gleichfalls ungeklärt.

PROTACs stellen einen eleganten Ansatz dar, um katalytische und nicht-katalytische Funktionen eines Proteins zu adressieren. Im Folgenden berichten wir die Entwicklung und Charakterisierung des ersten PROTACs für aktives CHK1. Unsere Daten legen nahe, dass innovative pharmakologische Strategien mit PROTACs sowohl die enzymatischen als auch die strukturellen Eigenschaften von CHK1 in Tumorzellen aushebeln können.

Ergebnisse und Diskussion

Expressionsniveau von CHK1 korreliert mit schlechter klinischer Prognose

Die GEPIA2-Datenbank erlaubt vergleichende Analysen von Genexpressionsmustern in gesundem und tumorösem Gewebe sowie den Zusammenhang von Genexpressionsmustern mit der Krebsprogression. Wir nutzten diese Datenbank zur Untersuchung von CHK1. Dabei zeigte sich, dass die Überlebensraten von Krebspatientinnen und -patienten hochsignifikant mit den *CHK1* mRNA-Expressionsspiegeln korrelierte. Grundlage waren Daten von 4741 Patientinnen und Patienten, 33 Tumorentitäten und Beobachtungszeiträumen von über 300 Monaten. Für die Kinase ATR, die CHK1 aktiviert, war dieser Zusammenhang deutlich schwächer ausgeprägt (Abbildung 1a). Eine detaillierte Analyse der GEPIA2-Datenbank verdeutlicht zudem Korrelationen zwischen hohen versus niedrigen CHK1-Expressionsniveaus und dem Gesamtüberleben in einzelnen Tumorsubtypen (Abbildung S1). In 20 dieser Tumorentitäten ist *CHK1* im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert (Abbildung 1b),

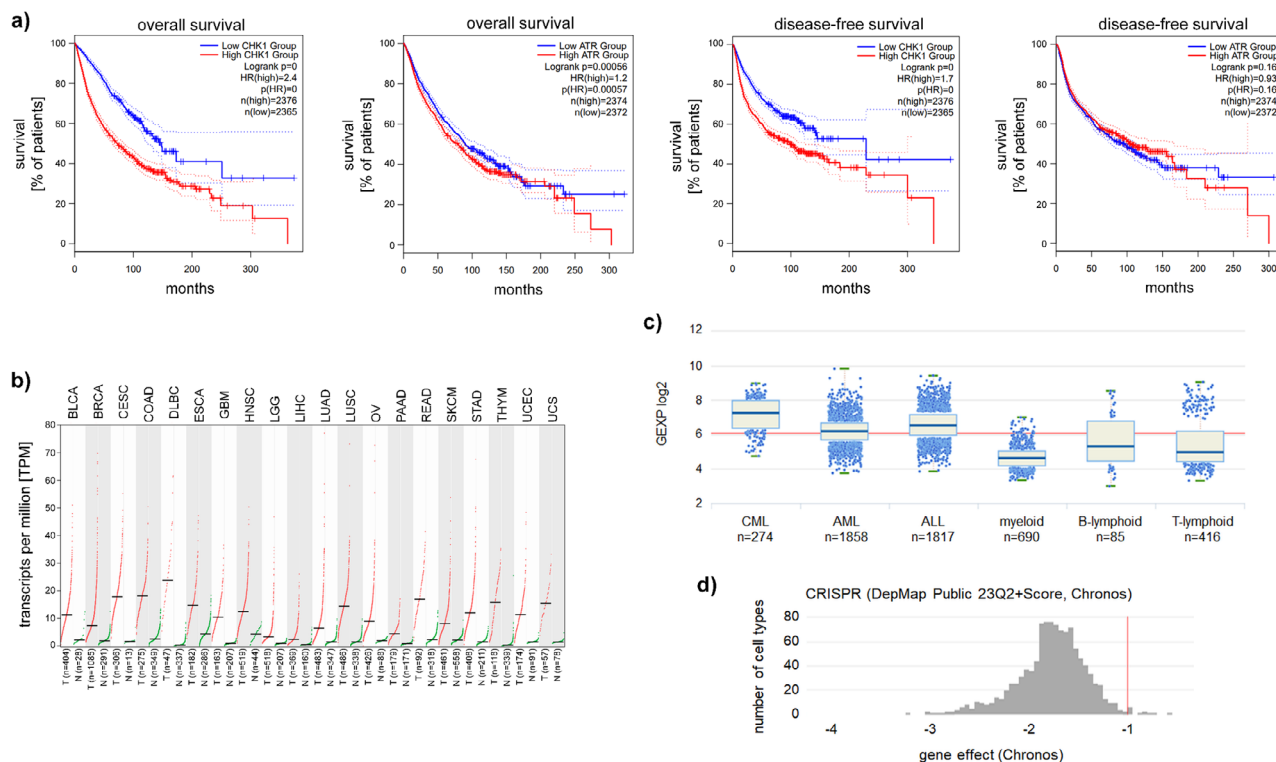


Abbildung 1. Datenbank-Analysen zeigen eine Verbindung zwischen der Expression von CHK1 und der Krankheitsprogression bei mehreren Tumortypen. a) Die GEPIA2-Datenbank zeigt Korrelationen zwischen der Expression von CHK1 bzw. ATR und dem Gesamt- bzw. krankheitsfreien Überleben von Patientinnen und Patienten (Cutoff 25 % niedrig und 75 % hoch; GEPIA2 integriert Informationen aus den TCGA- und GTEx-Datenbanken). Der p-Wert für CHK1 ist so niedrig, dass er praktisch 0 entspricht. b) Die mRNA-Spiegel von CHK1 wurden gemessen und zeigten eine Überexpression in 20 Tumorentitäten. Die TCGA-Datenbank annotiert die Tumortypen wie folgt: BLCA, Blasenkarzinom (urothelial); BRCA, invasives Mammakarzinom; CESC, Zervixkarzinom (Plattenepithelkarzinom und endozervikales Adenokarzinom); COAD, Kolonadenokarzinom; DLBC, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; ESCA, Ösophaguskarzinom; GBM, Glioblastoma multiforme; HNSC, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom; LGG, niedriggradiges Gliom; LIHC, hepatozelluläres Karzinom; LUAD, Lungenadenokarzinom; LUSC, Lungenplattenepithelkarzinom; OV, seröses Ovarialkarzinom; PAAD, Pankreasadenokarzinom; READ, Rektumadenokarzinom; SKCM, kutanes Melanom; STAD, Magenadenokarzinom; THYM, Thymom; UCEC, Endometriumkarzinom; UCS, Uteruskarzinom. c) Die HEMAP-Analyse zeigt die CHK1-mRNA-Expression in 274 CML-, 1858 AML- und 1817 ALL-Patientenproben im Vergleich zu entsprechenden 690 myeloiden, 85 B-lymphatischen und 416 T-lymphatischen Proben gesunder Spender. d) Das DepMap-Projekt (eine Kooperation des Broad Institute und des Wellcome Sanger Institute) analysiert großangelegte Datensätze zur Definition genetischer Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Therapeutika. CRISPR-Cas9-Screens zeigten, dass solide und hämatopoetische Tumorzellen von CHK1 abhängig sind ($n = 1100$); der Abhängigkeits-Cutoff wurde bei $-0,5$ gesetzt (<https://forum.depmap.org/t/depmap-genetic-dependencies-faq/131>). CHK1 wurde mittels CRISPR-Cas9 eliminiert, und 14 Tage später wurde die sgRNA-Expression in gepoolten Zellen untersucht. Ein Wert von 0 entspricht keinem Effekt, negative Werte weisen auf eine Abhängigkeit hin, die sich aus niedrigeren sgRNA-Niveaus in Zellen mit aktivem Cas9 ergibt.

was darauf hinweist, dass erhöhte CHK1-Spiegel mit der Zelltransformation assoziiert sind. Zur Untersuchung der *CHK1*-Expression in einem breiten Spektrum akuter myeloider/lymphatischer Leukämien (AML/ALL) nutzten wir die HEMAP-Datenbank. Die Analyse von 1858 AML- und 1817 ALL-Patientenproben sowie 690 myeloiden und 501 lymphatischen Proben gesunder Spender ergab, dass *CHK1* in den Leukämiezellen signifikant stärker exprimiert war (Abbildung 1c). Schließlich untersuchten wir die Bedeutung von CHK1 in Tumorzellen mithilfe der Cancer Dependency Map (DepMap). Die Analyse zeigte, dass CHK1 in verschiedenen soliden und hämatopoetischen Tumortypen ein essenzielles Gen darstellt (Abbildung 1d).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die vielfältigen Funktionen von CHK1 entscheidend zur Tumorentstehung beitragen.^[11] CHK1 erscheint somit als vielversprechendes therapeutisches Ziel in vielen Tumorerkrankungen.

Konstruktion von *CHK1*-PROTACs

Die oben dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass ein pharmakologisch gezielter Proteinabbau des CHK1 eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellt. Für die Entwicklung der ersten Serie von *CHK1*-PROTACs nutzten wir den potenten und selektiven, oralen *CHK1*-Inhibitor Rabusertib (LY2603618).^[14] Diesen ATP-kompetitiven Typ-I-Kinase-Hemmer wählten wir aufgrund seiner Eigenschaft, bevorzugt aktives *CHK1* zu hemmen.^[12] Wir vermuteten, dass diese besondere Eigenschaft die Entwicklung eines proteolytischen Inhibitors ermöglicht. Dieser sollte spezifisch das aktivierte *CHK1* in sich schnell replizierenden Tumorzellen mit ausgeprägtem Replikationsstress eliminieren. Zur Analyse der Interaktionen zwischen Inhibitoren und der ATP-Bindungstasche von *CHK1* führten wir Andockstudien durch und nutzten die verfügbare Kristallstruktur von *CHK1*

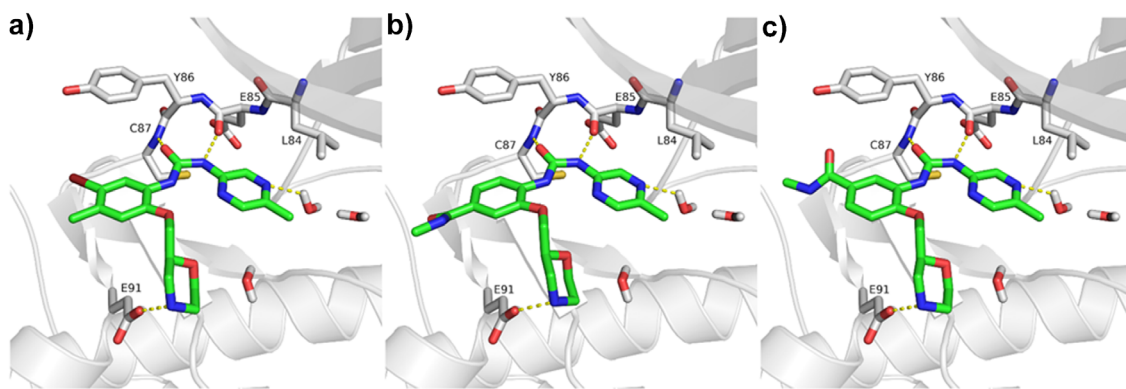
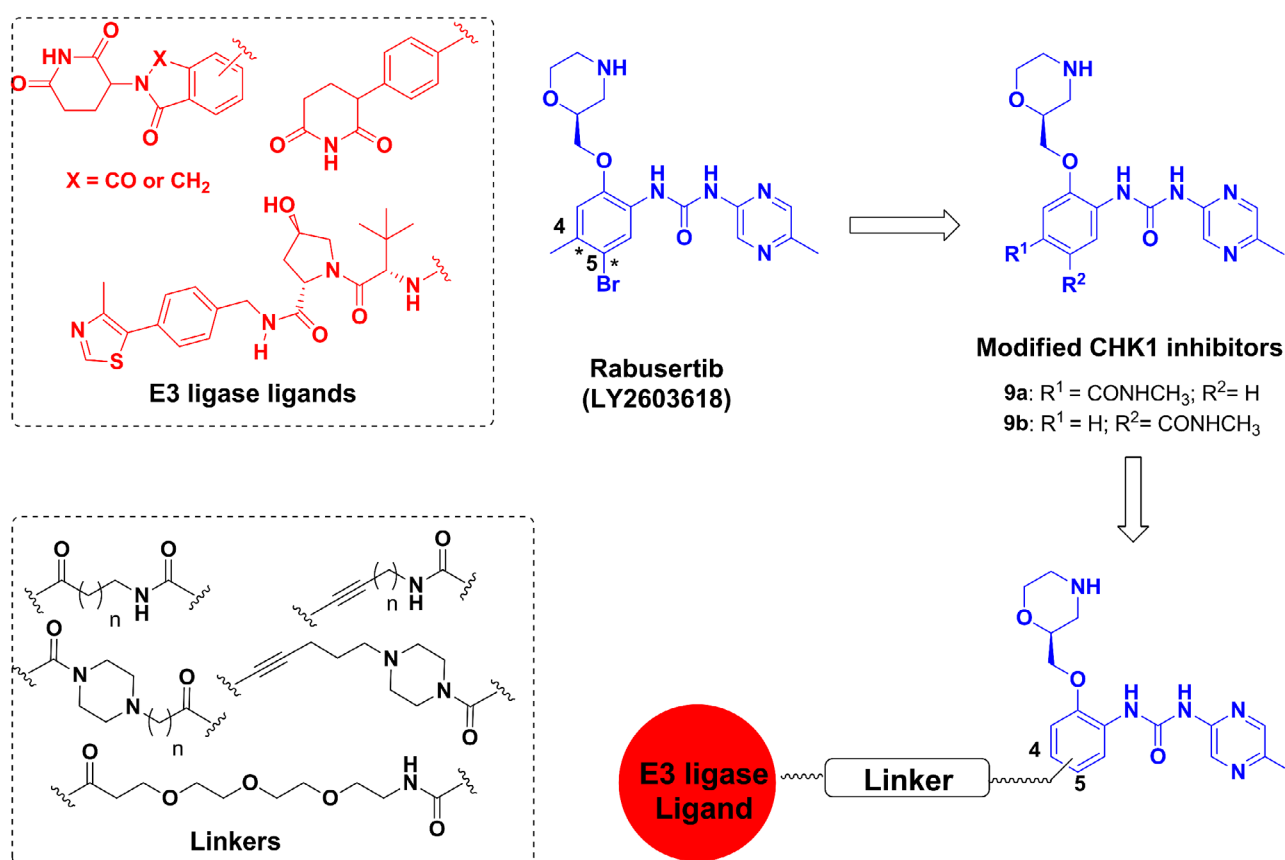


Abbildung 2. Dargestellte Bindungsmodelle für Rabusertib. a), 9a (b) und 9b (c) in CHK1 (PDB ID 4FT7). Das Protein-Backbone ist als weißes Cartoon dargestellt, die interagierenden Aminosäurereste der Bindungstasche sind in weißer Stabdarstellung gezeigt. Die CHK1-Inhibitoren erscheinen in Stabdarstellung, ihre Kohlenstoffatome sind grün eingefärbt. Drei konservierte Wassermoleküle in der Bindungstasche sind dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe gestrichelte Linien hervorgehoben.



Schema 1. Design der CHK1 PROTACs.

(PDB ID 4FT7). Diese Analysen zeigen, dass der endständige Phenylring von Rabusertib in Richtung der Lösungsmittelregion weist und sich daher als Ansatzpunkt für die Anbindung geeigneter Linker eignet; beispielsweise über eine Amidgruppe. Die Positionen 4 und 5 des Rings erwiesen sich als günstig für die Anheftung des Amids (Abbildung 2).

Auf dieser Grundlage erfolgte das Design der PROTACs als Austausch der Methylgruppe an Position 4 sowie des Bromatoms an Position 5 des terminalen aromatischen Rings von Rabusertib durch eine Carbonsäuregruppe. Dies konnte

für die Anbindung des Linkerteils der PROTACs genutzt werden (Schema 1). Diese modifizierten Inhibitoren 9a und 9b wurden anschließend *in vitro* gegen humanes CHK1 getestet (Eurofins Discovery, San Diego, CA, USA) und mit Rabusertib verglichen. Diese Analysen zeigten, dass 9a und 9b bei einer Konzentration von $1,0 \mu\text{M}$ eine Bindung an CHK1 von $95 \pm 0 \%$ bzw. $90 \pm 1 \%$ aufwiesen. Damit liegen die Werte im Bereich von Rabusertib ($98 \pm 1 \%$ Bindung bei $1,0 \mu\text{M}$), was darauf hinweist, dass die eingeführten chemischen Modifikationen die Bindungsaffinität

Tabelle 1: Chemische Strukturen der entwickelten CHK1-PROTACs.

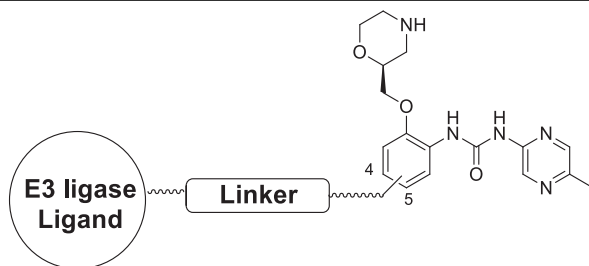
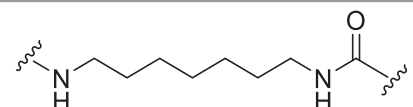
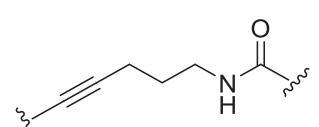
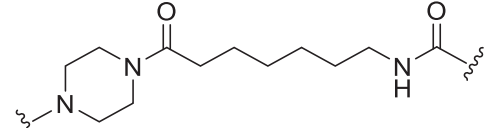
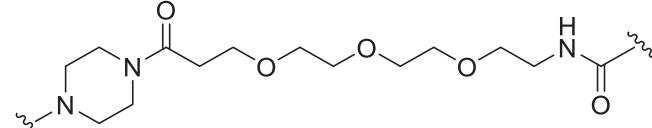
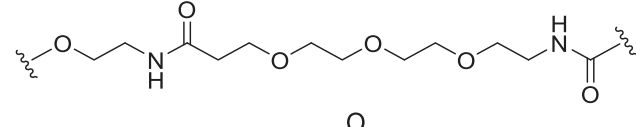
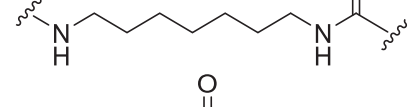
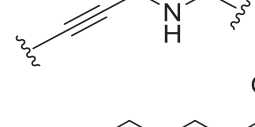
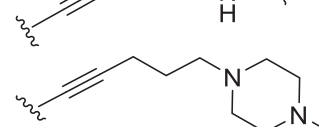

				
Cpd. Id	E3 ligase ligand	Linker	Tethering point	Degradation of CHK1 (5 μM, MIA PaCa-2)
41 (MA203)	A		4	50 %
42	B		4	20 %
43	C		4	0 %
44	C		4	20 %
45	D		4	20 %
46	A		5	20 %
47	B		5	0 %
48	B		5	0 %
49	B		5	20 %

Tabelle 1: (Continued)

Cpd. Id	E3 ligase ligand	Linker	Tethering point	Degradation of CHK1 (5 μ M, MIA PaCa-2)
50	C		5	10 %
51	D		5	0 %
52	E		4	20 %
53	E		4	20 %
54	E		5	20 %
55	E		5	20 %
56	E		4	0 %

zu CHK1 nicht wesentlich beeinträchtigen. Die modifizierten Inhibitoren wurden mit Alkyl-, Polyethylenglykol- oder rigideren zyklischen Linkern verbunden, an die wiederum Liganden für VHL oder CRBN (Pomalidomid, Lenalidomid und Phenylglutarimid) gekoppelt wurden (Schema 1). So synthetisierten wir 16 potenzielle CRBN- und VHL-basierte CHK1-PROTACs (Tabelle 1). Die detaillierten Syntheseprotokolle sowie die analytische Charakterisierung sind in der Zusatzinformation (SI) beschrieben. Da PROTACs in der Literatur gelegentlich als chemisch instabil berichtet wurden, prüften wir die Stabilität unserer neu entwickelten Substanzen bei 37°C in Zellkulturmedium über 72 h. Sowohl die VHL-basierten als auch die Mehrzahl der CRBN-basierten PROTACs erwiesen sich als hochstabil (Tabelle S1).

MA203 als wirksamstes CHK1-PROTAC

Zur funktionellen Charakterisierung der synthetisierten CHK1-PROTACs testeten wir deren Aktivität in einer Konzentrationsspanne von 1–5 μ M über 24 h in MIA PaCa-2 Pankreaskarzinomzellen (PDAC). Diese Zelllinie stammt aus dem Pankreaskarzinom eines 65-jährigen Patienten, weist eine p53-Mutation auf und ist durch DNA-Replikationsstress charakterisiert. Immunoblot-Analysen identifizierten drei

Aktivitätsklassen unserer neuen Verbindungen (Tabelle 1 und Abbildung S2). Das VHL-basierte PROTAC 56 sowie mehrere CRBN-Analoga, darunter die von Lenalidomid abgeleiteten PROTACs 47/48 (Alkin-Linker an Position 5), das Phenylglutarimid-basierte PROTAC 51 und das Pomalidomid-Piperazin-Derivat 43, führten zu keiner Reduktion von CHK1. Die VHL-basierten PROTACs 52–55, die Pomalidomid-Analoga 44/46 sowie das auf Lenalidomid basierte PROTAC 42 induzierten bei Gabe von 5 μ M einen CHK1-Verlust von etwa 20 %. Dies verdeutlicht, dass sehr kurze Linker – wie in den CRBN-basierten PROTACs 47 und 48 – inaktive Moleküle ergeben. Eine Verlängerung der Linkerstruktur, etwa durch Einführung einer Piperazineinheit in das PROTAC 48, resultierte hingegen in messbarer Aktivität, wie im Fall des PROTAC 49. Das CRBN-basierte PROTAC 41 (MA203) reduzierte die CHK1-Spiegel um etwa 50 % bei 5 μ M. Im Vergleich zu seinem Analoga 46 führte die Verlagerung des siebengliedrigen Alkyl-Linkers von Position 5 auf Position 4 in MA203 zu einer deutlich verstärkten Degradation des CHK1, was auf eine verbesserte Ternärkomplex-Bildung hindeutet. Die SAR-Analyse weist somit insbesondere auf Pomalidomid-basierte PROTACs mit flexiblen Alkyl-Linkern an Position 4 als effektivste CHK1-Degrader hin, während CRBN-PROTACs mit polaren PEG-Linkern oder auf Lenalidomid basierten Liganden deutlich

geringere Potenz aufweisen. Um die Bindung von MA203 als aktivsten PROTACs an CHK1 zu bestätigen, führten wir *in vitro*-Tests durch. MA203 und Rabusertib banden mit vergleichbaren Affinitäten an CHK1 ($97 \pm 0 \%$ bei $1,0 \mu\text{M}$). Darüber hinaus bestimmten wir die Plasmaproteinbindung und -stabilität von MA203. Die Plasmaproteinbindung betrug 55% . Zur Stabilitätsprüfung wurde MA203 ($20 \mu\text{M}$, DMSO-Lösungsmittelkonzentration 1%) bei 37°C inkubiert; die verbleibenden Substanzmengen wurden zwischen 5 min und 6 h erfasst. Nach 2 h konnten noch etwa 70% und nach 6 h rund 40% des Ausgangsmoleküls nachgewiesen werden. Als Referenz diente Verbindung 9a (Abbildung S3).

Da Rabusertib bevorzugt aktives CHK1 bindet und dadurch inaktiviert,^[12] postulierten wir, dass eine Aktivierung von CHK1 dessen Abbau durch MA203 fördert. Zur Aktivierung von CHK1 nutzten wir Hydroxyharnstoff (HU). Dieses Chemotherapeutikum hemmt die regulatorische Untereinheit M2 der Ribonukleotidreduktase (RRM2). Dies führt in der Konsequenz zu einer Leerung des dNTP-Pools, einem Anhalten von DNA-Replikationsgabeln und folglich zu einer Aktivierung des S-Phase-Checkpoints über den ATR/CHK1-Signalweg.^[15] Eine Behandlung mit $2 \mu\text{M}$ MA203 reduzierte die CHK1-Spiegel hochsignifikant um bis zu 80% in HU-behandelten MIA PaCa-2-Zellen und um 50% in MOLT-4-Zellen (Abbildung 3a,b). MOLT-4-Zellen stammen aus einer rezidierten akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) eines 19-jährigen Patienten. Kombinationen der PROTACs 44, 49, 54 oder 55 mit HU führten nur zu marginalen Effekten (Abbildung S4). Alle weiteren Untersuchungen wurden daher mit MA203 durchgeführt.

Zur Überprüfung der Selektivität von MA203 analysierten wir mögliche Effekte auf die eng mit CHK1 verwandte Kinase CHK2. Weder MA203 allein noch in Kombination mit HU veränderte die CHK2-Proteinspiegel in MIA PaCa-2- oder MOLT-4-Zellen (Abbildung 3a,b). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der hohen Selektivität von Rabusertib für CHK1.^[8]

PROTACs können zum Abbau physiologisch relevanter Neosubstrate führen. MA203 enthält chemische Modifikationen, die ein Umgehen solcher Effekte nahelegen.^[16] Immunoblot-Analysen zeigten, dass MA203 weder das proliferationsfördernde CRBN-Neosubstrat GSPT1/eRF3a/b noch die bekannten CRBN-Neosubstrate IKZF1 oder CK1 α ,^[17] reduzierte (Abbildung 3a,b). Diese Ergebnisse bestätigen die Spezifität von MA203 und deuten darauf hin, dass die Fähigkeit, CHK1 abzubauen, nicht auf einer unspezifischen Induktion CRBN-abhängiger Proteindegradation beruht.

Zeitverlaufsanalysen verdeutlichten, dass der Abbau von CHK1 durch MA203 bereits nach 3 h einsetzte und nach 10–16 h zu einer Reduktion um 50 – 70% führte. Dabei unterdrückte MA203 die HU-induzierte Hyperphosphorylierung von CHK1 an S296, verstärkte jedoch die HU-induzierte Hyperphosphorylierung an S345 (Abbildung 3c). Diese Befunde entsprechen einem bekannten Mechanismus, wonach pharmakologische CHK1-Hemmung die ATR/ATM-vermittelte Phosphorylierung von CHK1 an S345 erhöht, während die CHK1-Autophosphorylierung an S296 reduziert

wird.^[12] Da diese posttranslationalen Modifikationen prädiktive Biomarker für die CHK1-Inhibitorsensitivität von Zellen darstellen,^[8,18] spricht diese Beobachtung für einen Vorteil von MA203 gegenüber reinen CHK1-Inhibitoren, die CHK1 nicht abbauen. Die CHK2-Spiegel blieben während des analysierten Zeitverlaufs unverändert, was die Selektivität des MA203 für CHK1 bestätigt (Abbildung 3c).

Um sicherzustellen, dass die CHK1-Degradation auf die CRBN-rekrutierende Domäne von MA203 und nicht auf dessen Inhibitor-Anteil zurückzuführen ist, nutzten wir das Rabusertib-Analog 9a. Dieser ATP-kompetitive CHK1-Inhibitor entspricht der Inhibitor-Komponente von MA203.^[12] Während MA203 CHK1 um ca. 70% reduzierte, zeigte 9a keinen Effekt (Abbildung 3d). Ebenso führte eine Behandlung mit hoher Dosis Pomalidomid ($100 \mu\text{M}$) nicht zu einem CHK1-Verlust, wohingegen $2 \mu\text{M}$ MA203 $\pm 0,5 \text{ mM}$ HU CHK1 effizient nach 16 h dezimierten (Abbildung 3e). Dies bestätigt, dass die heterobifunktionalen Eigenschaften von MA203 für den Abbau von CHK1 erforderlich sind.

Da HU klinisch in der Behandlung von Leukämien und Glioblastomen eingesetzt wird,^[19] testeten wir die Wirksamkeit von MA203 in Kombination mit HU in weiteren Tumorzellmodellen. In ALL-Zellen (MOLT-4, RS4-11), AML-Zellen mit FLT3-ITD-Mutation (MOLM-13) sowie in kolorektalen Karzinomzellen (HCT116) reduzierte MA203 in Kombination mit HU die CHK1-Spiegel signifikant auf 40 – 50% der in unbehandelten Zellen gemessenen Werte. Auch in MOLM-13-Zellen wurde CHK1 durch diese Kombination abgeschwächt (Abbildung 3f,g).

Wir haben dann untersucht, ob verschiedene Arten von DNA-Replikationsstress/DNA-Schäden die Eliminierung von CHK1 durch MA203 beschleunigen. Mehrere solide Tumore, wie CRC und PDAC, wurden von uns mit Irinotecan behandelt. Sein aktiver Metabolit SN38 führt zu Topoisomerase-I-DNA-Komplexen. Dadurch entstehen einzelsträngige DNA (ssDNA)-Brüche, die zu DSBs werden können.^[20] Das Nukleosidanalogon Cytarabin (Ara-C) ist eines der am besten etablierten Chemotherapeutika für die Behandlung von Leukämien.^[21,22] Ara-C wird schnell in Cytosinarabinosidtriphosphat umgewandelt, das in Konkurrenz mit Desoxycytidintriphosphat in neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Dies führt zu DNA-Replikationsstress und DSBs.^[23] Durch ihre Effekte auf die DNA-Replikation/-Integrität aktivieren diese Chemotherapeutika die ATR-CHK1-Signalkaskade.^[24] Wir behandelten MIA PaCa-2- und HCT116-Zellen für 24 h mit MA203 \pm Irinotecan. In MIA PaCa-2-Zellen reduzierte MA203 in Kombination mit $5 \mu\text{M}$ Irinotecan das CHK1 dosisabhängig und effizienter als bei alleiniger Anwendung (Abbildung S5A). In HCT116-Zellen verursachten $2 \mu\text{M}$ MA203 plus 5 – $10 \mu\text{M}$ Irinotecan eine 50 – 60 -prozentige Verringerung von CHK1 (Abbildung S5B). Der Abbau von CHK1 durch verschiedene Dosen von MA203 ($0,5$, 1 , 2 , 5 und $10 \mu\text{M}$ für 24 h) wurde verstärkt, wenn sie mit $2 \mu\text{M}$ Ara-C (für 8 h) in MOLT-4-Zellen appliziert wurden. Die Konzentrationen von MA203, die einen halbmaximalen CHK1-Abbau (DC_{50} , $387,4 \text{ nM}$) hervorriefen, waren in dieser Konstellation deutlich niedriger als bei alleiniger Verwendung von MA203 ($3,86 \mu\text{M}$) (Abbildung S5C).

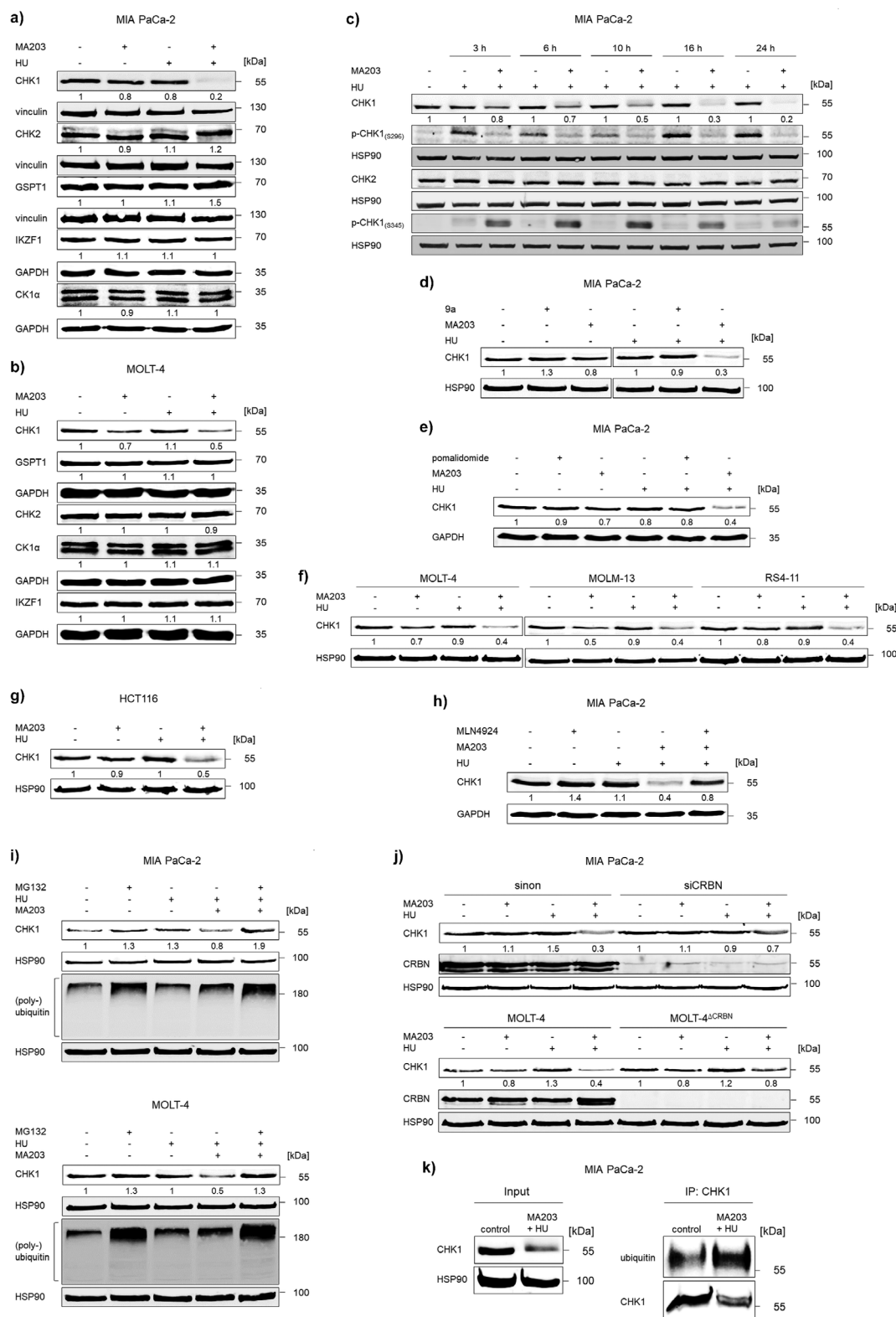


Abbildung 3. Charakterisierung der Spezifität von MA203. a) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, zeigen die Proteine CHK1, CHK2, GSPT1, IKZF1 und CK1 α ; Vinculin und GAPDH dienen als unabhängige Beladungskontrollen. b) Immunoblots von Lysaten aus MOLT-4-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU (4 h) behandelt wurden, weisen CHK1, GSPT1, CHK2, CK1 α und IKZF1 nach; GAPDH diente als Beladungskontrolle. c) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die für 3, 6, 10, 16 und 24 h mit 2 μ M MA203+1 mM HU behandelt wurden, zeigen CHK1, p-CHK1(S296), CHK2 und p-CHK1(S345); HSP90 diente als unabhängige Beladungskontrolle. d) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, weisen CHK1 nach; HSP90 diente als Beladungskontrolle. e) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 17 h mit 100 μ M Pomalidomid oder 16 h mit 2 μ M

Diese Daten zeigen, dass MA203 in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika CHK1 in mehreren Tumorsystemen eliminiert.

MA203 induziert den proteasomalen Abbau von CHK1 über CRBN

Der pharmakologische Wirkmechanismus von PROTACs beruht auf dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).^[5,6] Die Aktivierung von Cullin-RING-Ligasen (CRLs) erfordert die Bindung des Ubiquitin-ähnlichen Moleküls NEDD8 an einen C-terminalen Lysinrest der Culline. Diese posttranslationale Modifikation führt zur Dissoziation des negativen Regulators CAND1, ermöglicht die Assemblierung funktioneller CRLs und resultiert in der Ubiquitinierung von Substraten.^[25] Um zu prüfen, ob MA203 einen solchen E3-Ligase-Komplex für den Abbau von CHK1 benötigt, behandelten wir MIA PaCa-2-Zellen 24 h mit MA203+HU und applizierten in den letzten 8 h den NEDDylisierungsinhibitor MLN4924 (3 μ M). Dieser hemmte die durch MA203+HU induzierte CHK1-Proteinreduktion signifikant (Abbildung 3b).

Zur Bestätigung, dass MA203 den proteasomalen Abbau von CHK1 auslöst, setzten wir den Proteasomeninhibitor MG132 ein. Um zellulären Stress infolge einer längerfristigen Proteasomenblockade zu vermeiden, wurde MG132 lediglich für 6 h verabreicht. MG132 verhinderte vollständig die Abnahme von CHK1 in MIA PaCa-2- und MOLT-4-Zellen, die mit MA203 und HU behandelt wurden. Der Nachweis hochmolekularer Polyubiquitin-Signale im Immunoblot bestätigte die erwünschte Aktivität von MG132 (Abbildung 3i).

Diese Ergebnisse belegen, dass MA203 eine CRL-abhängige proteasomale Degradation von CHK1 induziert.

MA203 verstärkt HU-induzierten DNA-Replikationsstress und DNA-Schäden

Anschließend untersuchten wir, wie MA203 den durch Chemotherapeutika induzierten DNA-Replikationsstress und resultierende DNA-Schäden beeinflusst. Durch HU angehaltene DNA-Replikationsgabeln führen bei fortgesetzter

DNA-Helikase-Aktivität zur Anhäufung von ssDNA. Diese wird durch das Replikationsprotein A (RPA) geschützt. Ferner rekrutiert RPA das ATR-interagierende Protein ATRIP und ATR, um eine Erschöpfung des RPA-Pools zu verhindern.^[15,26] Die nachfolgende Aktivierung des S-Phase-Checkpoints durch den ATR-CHK1-Signalweg führt zu Zellzyklusarrest, unterbindet eine unkontrollierte Aktivierung von DNA-Replikationsursprüngen und stabilisiert blockierte DNA-Replikationsgabeln.^[15] Eine Depletion von CHK1 gefährdet folglich die Integrität derselben und begünstigt deren Kollaps, chromosomale Fragilität und DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs). Diese Ereignisse werden in Summe als Replikationskatastrophe der DNA bezeichnet.^[15,26]

Wir analysierten, ob MA203 den HU-induzierten DNA-Replikationsstress/DNA-Schaden verstärkt. Immunoblots gegen die an S139 phosphorylierte Form des Histons H2AX (γ H2AX) können diesen Marker für DNA-Replikationsstress und DNA-Schäden anzeigen.^[26] Wir fanden, dass HU den γ H2AX-Spiegel in MIA PaCa-2-Zellen um das 1,5-fache erhöhte, während HU+MA203 dessen hochsignifikante 4,2-fache Zunahme bewirkte (Abbildung 4a). Unterschiedliche Konzentrationen von MA203 (0,5–10 μ M) \pm HU (0,5 mM) bestätigten sowohl eine dosisabhängige CHK1-Degradation als auch eine Akkumulation von γ H2AX. In Kombination mit HU erreichte MA203 eine Maximaldegradation (D_{max}) von 92 % bei einer 50 %-igen Degradationskonstante (DC_{50}) von 1,51 μ M in MIA PaCa-2-Zellen und eine D_{max} von 93,2 % bei einer DC_{50} von 5,35 μ M in MOLT-4-Zellen. Ein antagonistischer Hook-Effekt (Wirkverlust bei Gabe hoher Dosen) war selbst bei den höchsten Konzentrationen an MA203 nicht erkennbar (Abbildung 4b).

Darüber hinaus beobachteten wir eine signifikante, 15,7-fache Induktion der ATM-Phosphorylierung an S1981 in HU+MA203-behandelten Zellen (Abbildung 4c). Dies entspricht der Aktivierung von ATM in Reaktion auf DSBs, die sich infolge von anhaltendem oder verstärktem DNA-Replikationsstress bilden, sowie der daraus resultierenden Phosphorylierung des H2AX.^[1] Vergleichbare Resultate erhielten wir nach ATR-Depletion durch das PROTAC Ramotac-1.^[27] Die Spiegel von ATM und ATR blieben durch MA203 unbeeinflusst (Abbildung 4c), was die Spezifität von MA203 für CHK1 hervorhebt.

MA203 \pm 0,5 mM HU behandelt wurden, zeigen CHK1; GAPDH diente als Beladungskontrolle. f) Immunoblots von Lysaten aus MOLT-4-, MOLT-13- und RS4-11-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU (4 h) behandelt wurden, zeigen CHK1; HSP90 diente als Beladungskontrolle. g) Immunoblots von Lysaten aus HCT116-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, zeigen CHK1; HSP90 diente als Beladungskontrolle. h) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203+1 mM HU \pm 3 μ M MLN4924 (8 h) behandelt wurden, zeigen CHK1; GAPDH diente als Beladungskontrolle. i) Oben: Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 6 h mit 2 μ M MA203+1 mM HU \pm 10 μ M MG132 behandelt wurden, zeigen CHK1 sowie hochmolekulare poly-Ubiquitin-Signale. Unten: Immunoblots von Lysaten aus MOLT-4-Zellen, die 6 h mit 2 μ M MA203+1 mM HU \pm 0,5 μ M MG132 behandelt wurden, zeigen CHK1 sowie hochmolekulare poly-Ubiquitin-Signale (positive Kontrolle für die Proteasomenhemmung durch MG132); HSP90 diente als unabhängige Beladungskontrolle. j) Oben: Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen (mit und ohne CRBN-Knockdown durch RNAi), die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, zeigen CHK1 und CRBN. Unten: Immunoblots von Lysaten aus MOLT-4-Wildtyp- und Δ CRBN-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU (4 h) behandelt wurden, zeigen CHK1 und CRBN; HSP90 diente als Beladungskontrolle. k) Immunopräzipitation von CHK1 aus Lysaten von MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203+1 mM HU behandelt wurden. Immunoblots zeigen CHK1 und Ubiquitin; HSP90 diente als Beladungskontrolle für den Input der zur Immunpräzipitation eingesetzten Lysate. Die Zahlen unterhalb der Proteinsignale geben die Werte der densitometrischen Analysen der Proteinexpression an, normalisiert auf die jeweilige Beladungskontrolle. Die Proteinspiegel unbehandelter Zellen wurden als 1,0 definiert. Die CHK1-Werte in (c) beziehen sich auf die MA203+HU-behandelten Zellen im Vergleich zu den HU-kontrollierten Zellen desselben Zeitpunkts (n = 2).

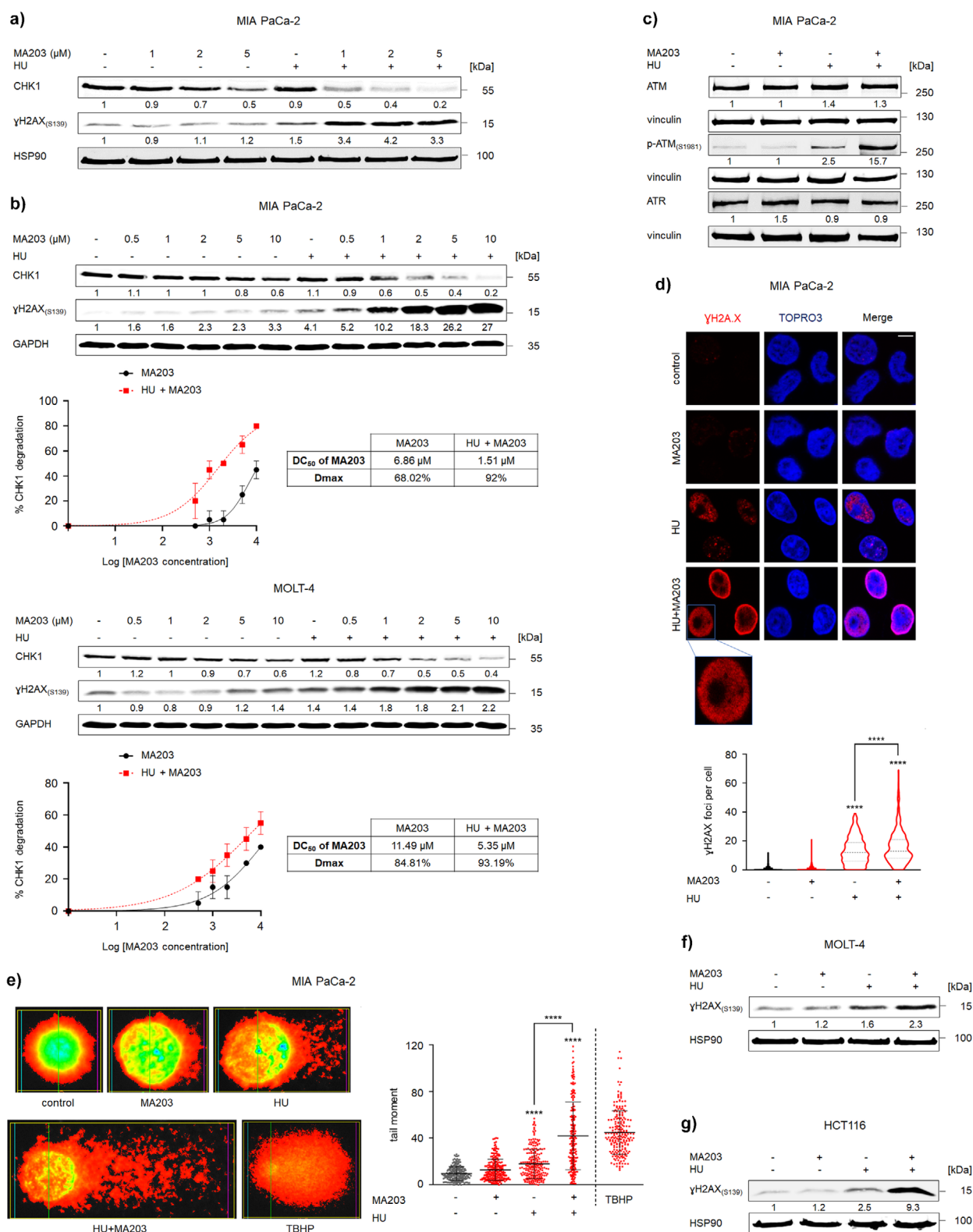


Abbildung 4. Das CHK1-PROTAC MA203 verstärkt DNA-Schäden bei HU-induziertem DNA-Replikationsstress. a) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 1, 2 oder 5 μM MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, zeigen CHK1 und $\gamma\text{H2AX}_{(\text{S139})}$; HSP90 diente als Beladungskontrolle. b) Oben: Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 0,5, 1, 2, 5 oder 10 μM MA203 \pm 0,5 mM HU behandelt wurden, zeigen CHK1 und $\gamma\text{H2AX}_{(\text{S139})}$. Unten: Immunoblots von Lysaten aus MOLT-4-Zellen, die 24 h mit 0,5, 1, 2, 5 oder 10 μM MA203 \pm 0,5 mM HU (8 h) behandelt wurden, zeigen CHK1 und $\gamma\text{H2AX}_{(\text{S139})}$; GAPDH diente als unabhängige Beladungskontrolle. Nichtlineare Regressionskurven zeigen den prozentualen Abbau von CHK1 in MIA PaCa-2- (oben) und MOLT-4-Zellen (unten) sowie die ermittelten DC₅₀- und Dmax-Werte nach MA203-Behandlung. Die Daten sind mit log(MA203)-Konzentrationen in nM auf der x-Achse und normierten Abbauwerten auf der y-Achse

Konfokale Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass MA203+HU eine signifikant höhere Akkumulation von γ H2AX-Foci in MIA PaCa-2-Zellen induzierte als HU allein (Abbildung 4d). Auch der alkalische Kometen-Assay, der einzelsträngige DNA-Brüche in Einzelzellen misst,^[28] bestätigte verstärkte DNA-Schäden durch MA203+HU. HU erzeugte einen mittleren Kometen-Moment von 17,8, wohingegen die Kombination mit MA203 diesen auf 41,9 erhöhte (Abbildung 4e).

Die HU+MA203-vermittelte γ H2AX-Induktion ließ sich in verschiedenen Tumorzellsystemen reproduzieren. In MOLT-4- und HCT116-Zellen verstärkte MA203 die HU-induzierte Hyperphosphorylierung von H2AX um das 2,3- bzw. 9,3-fache (Abbildung 4f,g).

Diese Ergebnisse zeigen, dass MA203 die DNA-Replikationsstressantwort in HU-behandelten Zellen in DNA-Schäden und eine Replikationskatastrophe überführt.

Kombinationen aus MA203 und HU töten Tumorzellen synergistisch

Hemmung des Checkpoint-Kinase-Signalwegs bei durch Chemotherapie induziertem Stress fördert die Akkumulation von DNA-Schäden und eliminiert Tumorzellen über den programmierten Zelltodweg der Apoptose.^[1,2] Wir behandelten verschiedene Tumorzellen mit 2 μ M MA203 in Kombination mit klinisch relevanten Dosen von HU (0,5–1 mM) und analysierten die Apoptoseinduktion mittels Durchflusszytometrie. Nach 48 h führte die Kombination von MA203 mit 0,5 mM HU in MIA PaCa-2-Zellkulturen zu einer signifikanten Zunahme früh- und spät-apoptotischer Zellen auf 15 % bzw. 14 %. Bei Anwendung von MA203 mit 1 mM HU stieg die Population früher apoptotischer Zellen signifikant auf 33 % an (Abbildung 5a).

In HCT116-Zellen induzierte MA203 in Kombination mit 0,5 mM HU nach 48 h signifikant frühe und späte Apoptose. Eine Akkumulation später apoptotischer Zellen (30 %) wurde bei Behandlung mit 2 μ M MA203 plus 1 mM HU beobachtet (Abbildung 5b). Die kombinierte Behandlung von MOLT-4-Zellen mit MA203 und 0,5 mM HU erhöhte die Population früher apoptotischer Zellen nach 24 h signifikant auf 19 % und später apoptotischer Zellen auf 15 %. In Gegenwart von 1 mM HU induzierte MA203 frühen (48 %) und späten (24 %) apoptotischen Zelltod (Abbildung 5c). In MOLM-13-Zellen führte MA203 plus 0,5 mM HU zu einer signifikanten Akkumulation früher

apoptotischer Zellen (33 %). In Kombination mit 1 mM HU verstärkte MA203 nach 24 h die späte Apoptose von MOLM-13-Zellen auf 50 % (Abbildung 5d).

Zur Untersuchung möglicher Effekte von MA203 auf nicht-maligne Zellen applizierten wir 1, 2, 5 und 10 μ M MA203 in Kombination mit 0,5–1 mM HU auf humane Netzhautpigmentepithelzellen (RPE1) und Knochenmark-Stromazellen (HS-5) für 24 h. Diese nicht aus Tumoren stammenden Zellen hatten durch diese Behandlungen keine signifikante Einschränkung ihrer Viabilität (Abbildung 5e). Darüber hinaus untersuchten wir, ob MA203 normale periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) aus gesundem Spenderblut schädigt. Nach 24 h verursachte MA203 \pm HU keinen Zelltod in B-Zellen, T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), Monozyten und dendritischen Zellen, die wir mittels spezifischer Antikörper unterscheiden (Abbildung 5f). Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass sich rasch proliferierende Leukämiezellen – im Gegensatz zu normalen Zellen – durch hohen DNA-Replikationsstress auszeichnen.^[1,2] MA203 allein oder in Kombination mit HU förderte sogar die Viabilität dendritischer Zellen (Abbildung 5f). Ein solcher Schutz antigenpräsentierender Zellen, die antitumorale Immunantworten vermitteln,^[29] birgt eventuell ein immuntherapeutisches Potenzial. Übereinstimmend wurde berichtet, dass der CHK1 Hemmer Prexasertib eine frühe Infiltration proinflammatorischer Immunzellen in solides Tumorgewebe verstärkt.^[30]

Um die toxischen Effekte der Kombination unseres PROTACs MA203 mit Ara-C in Leukämiezellen genauer zu erfassen, behandelten wir MOLT-4-Zellen für 24 h mit 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 μ M Ara-C \pm 2 μ M MA203. Diese Analysen ergaben, dass MA203 den Ara-C-vermittelten Zelltod deutlich verstärkte, was sich in einer 62 %-igen Reduktion der Ara-C-Konzentration spiegelte, die erforderlich war, um 50 % der Krebszellen abzutöten (IC_{50}) (Abbildung 6a).

Zur Überprüfung des Sicherheitsprofils solcher Kombinationen auf proliferierende normale PBMCs und deren Aktivierungsstatus isolierten wir PBMCs gesunder Spender und inkubierten sie 24 h mit Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (zur T-Zell-Aktivierung) oder R848 (zur B-Zell-Aktivierung). Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 2 μ M Ara-C \pm 2 μ M MA203 behandelt. Wir beobachteten, dass MA203 \pm Ara-C weder die Aktivierung noch die Viabilität von T- und B-Zellen beeinträchtigte (Abbildung 6b,c).

dargestellt. c) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, zeigen ATM, p-ATM(S1981) und ATR; Vinculin diente als unabhängige Beladungskontrolle. d) Immunfluoreszenzfärbungen (oben) von γ H2AX(S139) in MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden; TO-PRO-3 diente zur Kernfärbung (Skalierungsbalken: 15 μ m). Violin-Plot (unten) zeigt die Quantifizierung der γ H2AX-Foci ($n = 2 \pm$ SD; One-way ANOVA; Bonferroni-Multiple-Comparison-Test: **** $p \leq 0,0001$). e) Alkalischer Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Läsionen. Repräsentative Abbildungen von MIA PaCa-2-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, sind links dargestellt; eine 200 μ M TBHP-Behandlung für 2 h diente als positive Kontrolle für DNA-Strangbrüche. Scatter-Plot (rechts) zeigt den mittleren Tail Moment ($n = 2 \pm$ SD; One-way ANOVA; Bonferroni-Multiple-Comparison-Test: **** $p \leq 0,0001$). f) Immunoblots von Lysaten aus MOLT-4-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU (4 h) behandelt wurden, zeigen γ H2AX(S139); HSP90 diente als Beladungskontrolle. g) Immunoblots von Lysaten aus HCT116-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden, zeigen γ H2AX(S139); HSP90 diente als Beladungskontrolle. Die Zahlen unterhalb der dargestellten Proteine geben die Ergebnisse der densitometrischen Analysen der Proteinexpression an, normalisiert auf die jeweilige Beladungskontrolle; Proteinspiegel unbehandelter Zellen wurden als 1,0 definiert ($n = 2$).

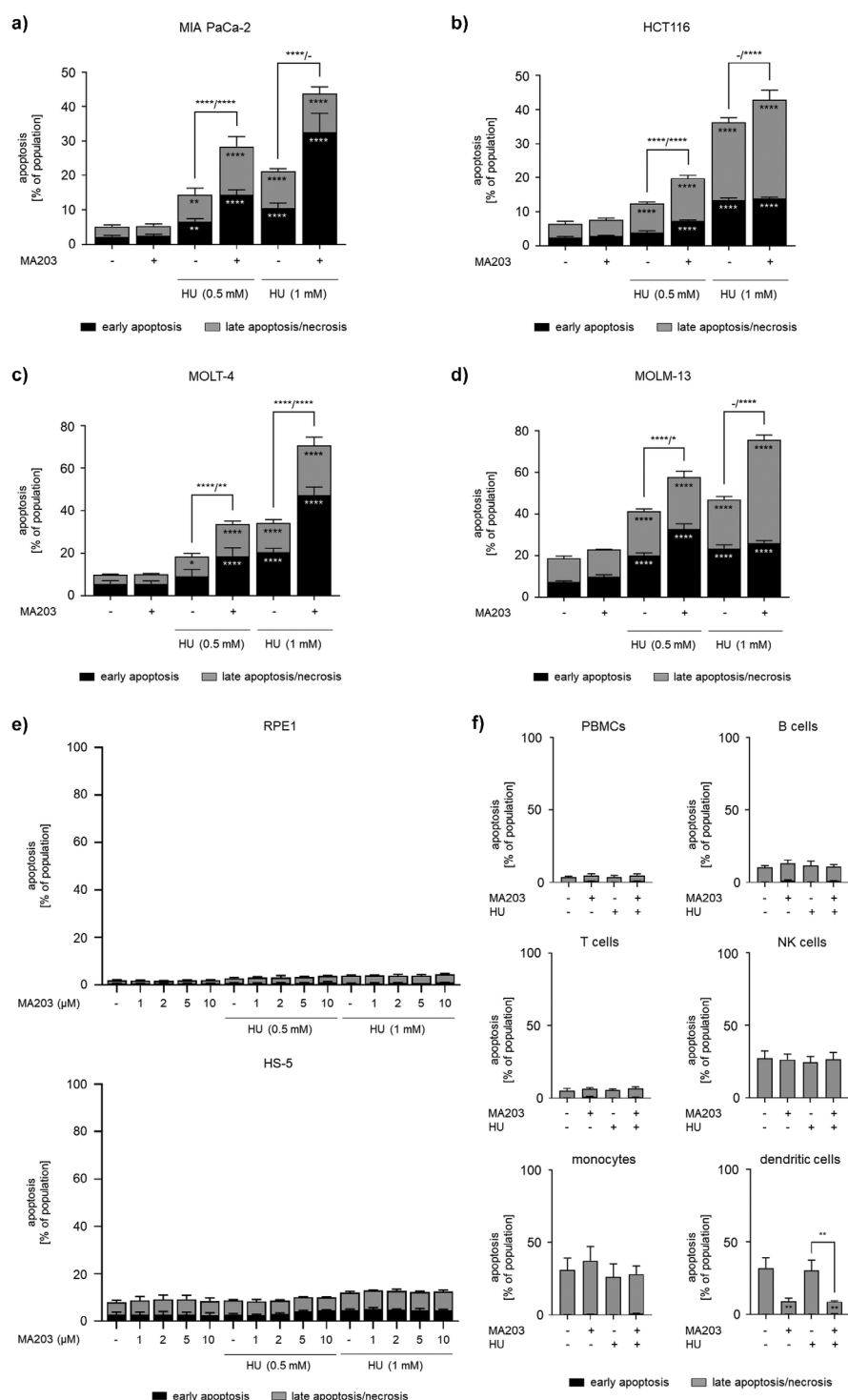


Abbildung 5. Apoptoseinduktion durch MA203 in Kombination mit HU. a) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von MIA PaCa-2-Zellen, die 48 h mit 2 μ M MA203 \pm 0,5 oder 1 mM HU behandelt wurden. b) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von HCT116-Zellen nach Inkubation mit 2 μ M MA203 \pm 0,5 oder 1 mM HU für 48 h. c) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von MOLT-4-Zellen nach Plättierung mit 2 μ M MA203 \pm 0,5 oder 1 mM HU für 24 h. d) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von MOLM-13-Zellen, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 0,5 oder 1 mM HU behandelt wurden. e) Oben: Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von RPE1-Zellen, die 24 h mit 1, 2, 5 oder 10 μ M MA203 \pm 0,5 oder 1 mM HU behandelt wurden. Unten: Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von HS-5-Zellen, die 24 h mit 1, 2, 5 oder 10 μ M MA203 \pm 0,5 oder 1 mM HU behandelt wurden. f) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von PBMCs, die 24 h mit 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU behandelt wurden. Die Zellpopulationen wurden anhand spezifischer Oberflächenmarker definiert: CD3⁺CD19⁺ (B-Zellen), CD3⁺ (T-Zellen), CD3⁺CD19⁺CD14⁺ (Monozyten), CD3⁺CD19⁺CD1c⁺ (dendritische Zellen), CD3⁺CD19⁺CD56⁺ (natürliche Killerzellen, NK) und CD3⁺CD14⁺CD19⁺CD56⁺CD11b⁺ (PMNs). Zellen wurden mit Annexin-V/FVD-eFl780 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf Zelluntergang untersucht ($n = 3 \pm$ SD; Two-way ANOVA; Bonferroni-Multiple-Comparison-Test: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$).

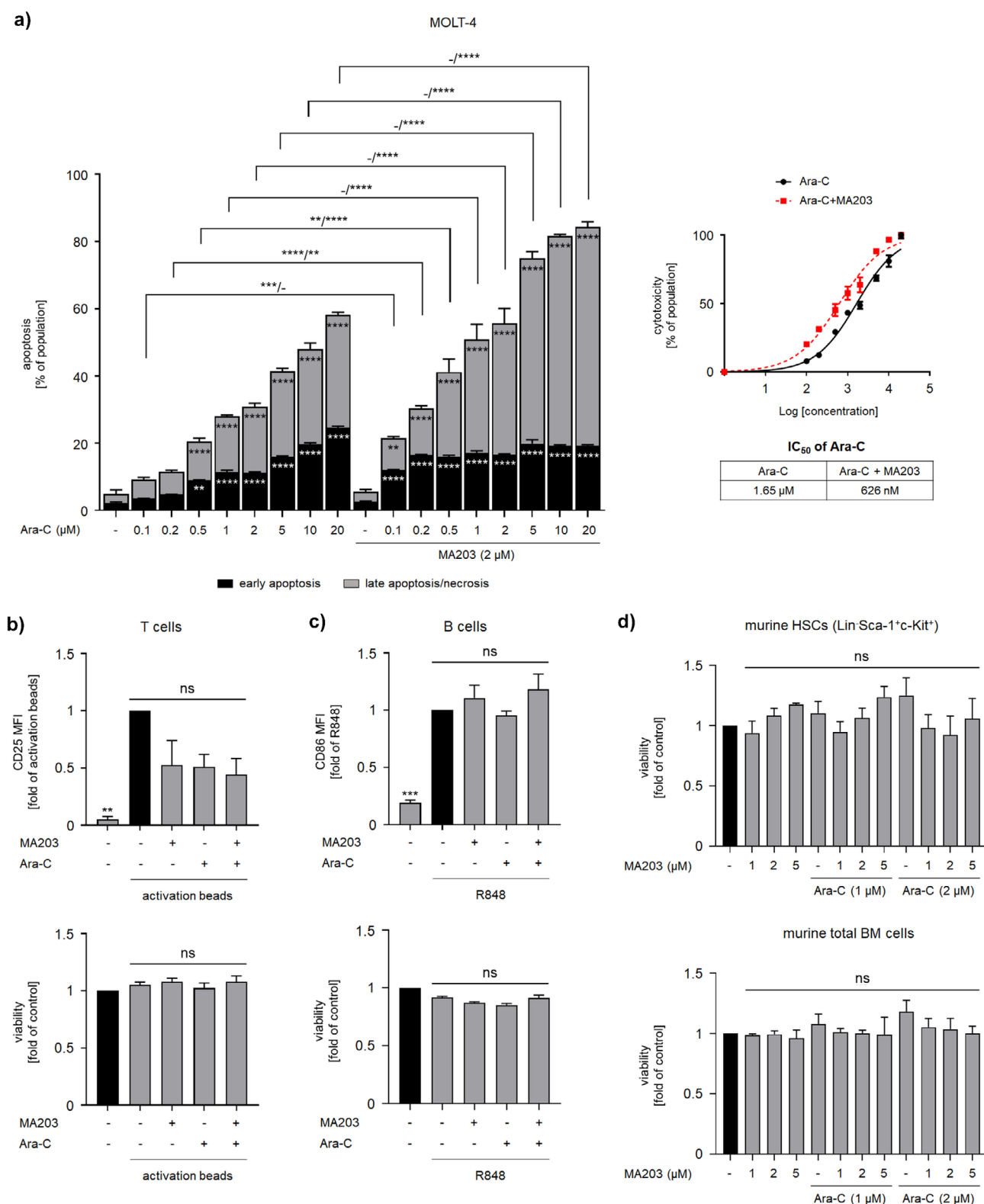


Abbildung 6. Apoptoseinduktion durch MA203 in Kombination mit Ara-C. a) Links: Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von MOLT-4-Zellen, die 24 h mit 2 μM MA203 ± 0,1–20 μM Ara-C behandelt wurden. Rechts: Nichtlineare Regressionskurve zur Bestimmung des IC₅₀-Werts von Ara-C ± MA203 auf MOLT-4-Zellen. Die Zellen wurden mit Annexin-V/PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf Zelluntergang untersucht (n = 3 ± SD; Two-way ANOVA; Bonferroni-Multiple-Comparison-Test: ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001). b) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramme von PBMCs, die 24 h mit Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 präinkubiert und anschließend 24 h mit 2 μM MA203 ± 2 μM Ara-C behandelt wurden. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie mit CD3-BV711 (T-Zellen), CD25-APC (T-Zell-Aktivierungsstatus, als MFI normalisiert zu Aktivierungsbeads) und FVD-eFl780 (Viabilität, normalisiert zur Kontrolle) gefärbt. c) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramme von PBMCs, die 24 h mit

Als Nächstes isolierten wir aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen hämatopoetische Stammzellen (HSCs, Lin-Sca-1+c-Kit+, entsprechen humanen CD34+ HSCs). Da MA203 ein auf die Bindung von CRBN-gerichtetes Molekül ist, sollte es in murinen Systemen keine Toxizität verursachen.^[31] Die HSCs wurden mit 1–2 μM Ara-C \pm 1, 2 und 5 μM MA203 inkubiert. In diesem primären Zellmodell konnten wir sehen, dass Ara-C und MA203 das Überleben dieser Zellen nicht signifikant beeinträchtigen (Abbildung 6d). Solche Befunde stimmen mit der Literatur überein.^[13]

Wir folgern, dass die Eliminierung von CHK1 durch MA203 unter DNA-Replikationsstress zum Zelltod von Tumorzellen führt, während gleichzeitig keine nennenswerte Toxizität in ruhenden oder proliferierenden, differenzierten und primitiven normalen Zellen nachweisbar ist. Dies rechtfertigt die weitere Charakterisierung von PROTACs, die CHK1 eliminieren.

Elimination von CHK1 dereguliert Überlebensproteine in Tumorzellen

Um die molekularen Mechanismen zu definieren, die der Vulnerabilität von MA203-behandelten MIA PaCa-2-Zellen gegenüber HU-induzierten DNA-Schäden und Apoptose zugrunde liegen, führten wir eine unvoreingenommene massenspektrometrie-gestützte Proteom-Analyse durch. Diese bestätigte die Fähigkeit von MA203 den Abbau von CHK1 in HU-behandelten Zellen auszulösen, ohne andere strukturell oder funktionell verwandte Kinasen zu beeinflussen (Abbildung 7a). Darüber hinaus führten die Monotherapien nicht zu einer Depletion von CHK1 oder verwandten Kinasen (Abbildung S6).

Ferner stellten wir fest, dass die kombinierte Behandlung mit MA203+HU über 24 h zu einer deutlichen und spezifischen Reduktion mehrerer Schlüsselproteine führte, die die Tumorentstehung und die DNA-Schadensreparatur kontrollieren. Hierzu zählen der Transkriptionsfaktor-7 (TCF7), das Zellzyklus-assoziierte Protein-7 (CDCA7), die Origin Recognition Complex-Untereinheit-1 (ORC1) sowie die Werner-Syndrom-RecQ-ähnliche DNA-Helikase (WRN) (Abbildung 7a).

Immunoblots mit spezifischen Antikörpern bestätigten die Daten der Proteomik. Wir beobachteten eine niedrigere Expression von TCF1/TCF7 und CDCA7 in MA203+HU-als in 9a+HU-behandelten Zellen (Abbildung 7b). Dieser Befund erklärt den durch MA203 in HU-behandelten Krebszellen gestörten S-Phasen-Eintritt und deren Progression. Cyclin A2, das zusammen mit CDK2 die DNA-

Replikation fördert, ist ein direkter Partner von CDCA7.^[32] Zudem induziert die Aktivierung des WNT-Signalwegs eine direkte Bindung des β -Catenin/TCF7-Komplexes an den Glutaminsynthetase-Promotor, was deren Expression steigert und so Glutaminsynthese sowie das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen fördert.^[33]

Das ORC1-Protein ist die kritischste Untereinheit des Origin Recognition Complex. Es ist essenziell für die Initiation der DNA-Replikation. ORC1 bindet spezifisch an DNA-Replikationsursprünge und dient als Plattform für den Aufbau von DNA-Präreplikationskomplexen.^[34] Im Vergleich zu unbehandelten MIA PaCa-2-Zellen zeigten 9a/MA203+HU-behandelte Zellen eine verminderte ORC1-Expression, was auf eine gestörte Bildung von Präreplikationskomplexen und damit blockierte DNA-Synthese hinweist (Abbildung 7b).

Die Proteomdaten deuten zudem auf eine schwach verstärkte Akkumulation von RRM2 in MA203+HU-behandelten Zellen hin (Abbildung 7a). Eine solche RRM2-Anreicherung ist entscheidend für die Erholung von DNA-Replikationsgabeln durch dNTP-Synthese.^[15] Immunoblots zeigten, dass 9a+HU eine ähnliche Induktion von RRM2 (4,8-fach) wie HU allein auslöste, wohingegen MA203+HU die HU-induzierte RRM2-Induktion (3,5-fach) nach 24 h abschwächte (Abbildung 7b). CHK1-Inhibitoren können über CDK2 eine proteasomale Degradation von RRM2 fördern.^[35] Dementsprechend unterdrückte CHK1-Elimination durch MA203 die HU-vermittelte RRM2-Induktion (1,8-fach) nach 48 h effektiver als 9a (3,1-fach) (Abbildung 7b).

Die WRN-Helikase/Exonuklease, die mit RPA interagiert, ist ein zentrales Überlebensprotein unter DNA-Replikationsstress. WRN erleichtert die Reaktivierung und Progression von Replikationsgabeln nach HU-induziertem Zellzyklusarrest.^[36] Zudem trägt WRN zur Aktivierung von CHK1 bei.^[37,38] In MIA PaCa-2-Zellen führte HU zu einem moderaten Anstieg von WRN. Im Gegensatz zu 9a schwächte MA203 die HU-induzierte WRN-Akkumulation deutlich ab und reduzierte deren Spiegel nach 24 h auf die Hälfte der Werte unbehandelter Zellen (Abbildung 7b). Der Verlust von WRN durch MA203 verstärkt HU-induzierte, unreparierte DNA-Replikationsläsionen, da WRN normalerweise die Bildung von DSBs an blockierten Gabeln in schnell proliferierenden Karzinomzellen verhindert.^[39,40] Diese Befunde stimmen mit den in Abbildung 4 dargestellten Daten überein.

Wir untersuchten ferner Claspin, das notwendig ist, um CHK1 unter DNA-Replikationsstress über die Vermittlung seiner Interaktion mit ATR zu aktivieren.^[41] Eine ausgeprägte Claspin-Akkumulation wurde nach HU-Behandlung von MIA PaCa-2-Zellen beobachtet. Die kombinierte

R848 präinkubiert und anschließend 24 h mit 2 μM MA203 \pm 2 μM Ara-C behandelt wurden. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie mit CD19-PE-eFl610 (B-Zellen), CD86-PE (B-Zell-Aktivierungsstatus, als MFI normalisiert zu R848) und FVD-eFl780 (Viabilität, normalisiert zur Kontrolle) gefärbt. d) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramme von Knochenmarkzellen (BM), die aus C57BL/6-Mäusen isoliert und 24 h mit 1, 2 oder 5 μM MA203 \pm 1 oder 2 μM Ara-C behandelt wurden. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie mit Sca-1-FITC, c-KIT-APC, CD3-PE, CD4-PE, CD8-PE, CD11b-PE, CD11c-PE, NK1.1-PE und Gr-1-PE gefärbt. Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) wurden als lin⁺ (PE) und gleichzeitig c-Kit⁺/Sca-1⁺ identifiziert. Die Viabilität von Gesamt-BM-Zellen und HSCs wurde mittels FVD-eFl780 bestimmt und zur Kontrolle normalisiert (n = 3 \pm SD; One-way ANOVA; Bonferroni-Multiple-Comparison-Test: ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001; ns, nicht signifikant).

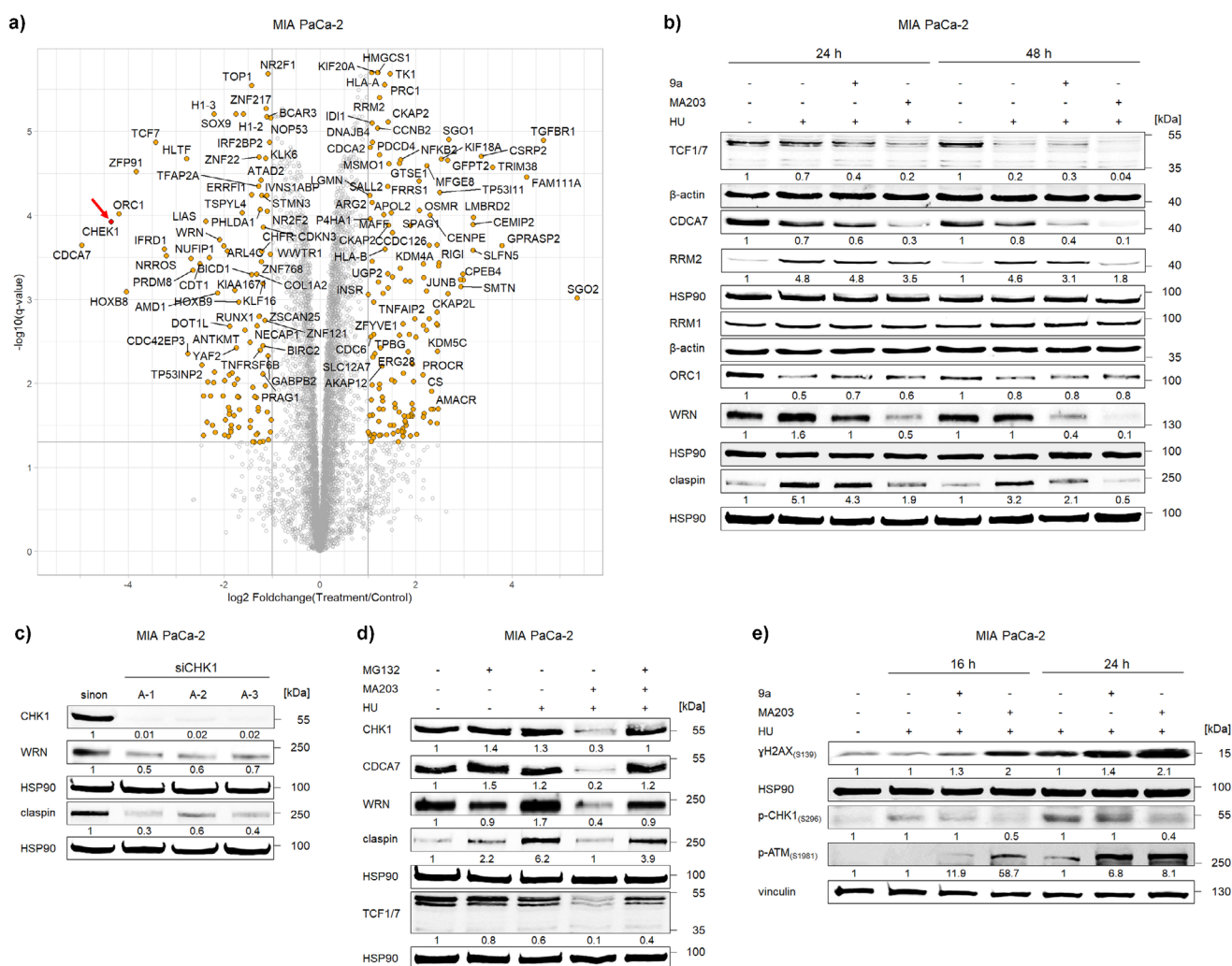


Abbildung 7. Fehlregulation zentraler tumorspezifischer Überlebensproteine durch das CHK1-PROTAC MA203. a) Volcano-Plot der globalen Proteinexpressionsprofile von MIA PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit 2 μ M MA203+1 mM HU für 24 h. Dargestellt sind der log2-Fold-Change sowie die Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die horizontale Linie markiert $q = 0,05$; Punkte oberhalb dieser Linie entsprechen q -Werten $< 0,05$. Punkte mit einem Fold-Change < 2 sind in grau dargestellt. Der rote Pfeil markiert CHEK1. b) Immunoblots aus Lysaten von MIA PaCa-2 Zellen, die mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 24 h bzw. 48 h behandelt wurden, zeigen die Expression von TCF1/7, CDCA7, RRM2, RRM1, ORC1, WRN und Claspin; HSP90 und β -Actin dienen als unabhängige Ladekontrollen. c) Immunoblots von MIA PaCa-2 Zellen nach Transfektion mit siRNA Negativkontrolle oder drei prädesignten siRNAs zum Knockdown von CHK1-mRNA für 48 h zeigen CHK1, WRN und Claspin; HSP90 dient als Ladekontrolle. d) Immunoblots aus Lysaten von MIA PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit 2 μ M MA203+1 mM HU für 24 h \pm 10 μ M MG132 für 12 h zeigen CHK1, CDCA7, WRN, Claspin und TCF1/7; HSP90 dient als Ladekontrolle. e) Immunoblots aus Lysaten von MIA PaCa-2 Zellen, die mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 16 h bzw. 24 h behandelt wurden, zeigen γ H2AX(S139), p-CHK1(S296) und p-ATM(S1981); HSP90 und Vinculin dienen als unabhängige Ladekontrollen. Unterhalb der angegebenen Proteine sind die Ergebnisse der densitometrischen Analysen dargestellt; die Proteinexpression wurde auf die jeweilige Ladekontrolle normalisiert, wobei die Werte unbehandelter Zellen als 1,0 definiert wurden. Die Proteinlevel in (e) wurden für 9a/MA203+HU-behandelte Zellen im Vergleich zu den HU-Kontrollen der jeweiligen Zeitpunkte berechnet ($n = 2$).

Behandlung mit 9a vermochte diese HU-induzierte Akkumulation nach 24 h nicht signifikant zu vermindern. Hingegen wurden basale Claspin-Expressionswerte in Zellen erreicht, die mit HU+MA203 behandelt wurden, (Abbildung 7b).

Wir vermuteten, dass die oben beschriebenen Schlüsselproteine, die die mit DNA-Replikationsstress verknüpfte Antwort kontrollieren, aufgrund der proteasomalen CHK1-Degradation durch MA203 verloren gehen. Um zu überprüfen, ob die Depletion von CDCA7, WRN, TCF1/7 und Claspin direkt auf den aktiven Abbau von CHK1 durch MA203+HU zurückzuführen ist, und nicht auf unspezifische

Effekte der Monotherapien, führten wir siRNA-Experimente durch (Abbildung S7). Diese genetische, über kleine RNAs vermittelte Eliminierung des CHK1 (zur Kontrolle mit drei unabhängigen siRNAs) in MIA PaCa-2-Zellen beeinträchtigte die Expression dieser Schlüsselproteine. Bemerkenswerterweise waren diese Proteine nach einer 24-stündigen Behandlung mit dem CHK1-Kinaseinhibitor 9a nicht betroffen (Abbildung 7b). Dies und die genetische siRNA Methode bestätigt, dass die Elimination von CHK1 ursächlich für den Verlust von WRN und Claspin ist. Zudem prüften wir, ob der Proteasomeninhibitor MG132 den Verlust von WRN und

Claspin abschwächen kann. Tatsächlich wurden beide Proteine durch eine 12-stündige Behandlung mit 10 μ M MG132 in MA203+HU-behandelten Zellen gerettet (Abbildung 7d). Dies weist auf einen Mechanismus hin, bei dem CHK1-Abbau durch PROTACs -und nicht nur Kinasehemmung-differenziell Proteine destabilisiert, die DNA-Reparatur und den Neustart von DNA-Replikationsgabeln kontrollieren.

Um zu prüfen, ob MA203 eine frühere und stärkere DNA-Schädigung auslöst als 9a, verglichen wir die Effekte von MA203+HU und 9a+HU nach 16–24 h (Abbildung 7e). Erwartungsgemäß stellten wir eine DNA-schadensabhängige Hyperphosphorylierung von ATM an S1981,^[1] in MA203+HU-behandelten Zellen fest. Sowohl nach 16 h als auch nach 24 h akkumulierten γ H2AX und pS1981-ATM stärker in HU+MA203- als in HU+9a-behandelten Zellen (Abbildung 7e). Diese ATM-Aktivierung kann WRN von kollabierten DNA-Replikationsgabeln verdrängen und den Weg für eine über das Protein RAD51 vermittelte DNA-Reparatur sichern. Diese ist von CHK1 abhängig.^[40] Bemerkenswerterweise war in MA203+HU-behandelten Zellen die CHK1-Autophosphorylierung an S296, die für die volle Kinaseaktivität wesentlich ist,^[12] um 40–50 % reduziert. Die Substanz 9a hemmte CHK1 zu diesen frühen Zeitpunkten nicht (Abbildung 7e). Dies zeigt die überlegene Wirkung der CHK1-Elimination durch MA203.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die MA203-vermittelte CHK1-Elimination der Kinasehemmung überlegen ist, da sie die DNA-Reparatur, die S-Phase-Prozessivität unter Behandlung mit Chemotherapeutika und das Tumorzellwachstum stärker beeinträchtigt. Darüber hinaus offenbaren wir eine bislang unbekannte Rolle von CHK1 bei der Stabilisierung von Proteinen, die eine korrekte DNA-Replikation und -Reparatur gewährleisten.

Die Elimination von CHK1 produziert stärkere antitumorale Effekte als die Hemmung von CHK1

Wir analysierten anschließend, wie sich eine Hemmung der CHK1-Kinase gegenüber einer Eliminierung von CHK1 auf die Zellzyklusprofile von MIA PaCa-2-Zellen auswirkt. In unbehandelten MIA PaCa-2-Zellpopulationen befanden sich 55 % der Zellen in der G1-Phase und 1 % in der SubG1-Phase (abgestorbene Zellen mit fragmentierter DNA). Die anderen Zellen waren proliferativ und befanden sich in der S- bzw. der G2/M-Phase. Weder 9a noch MA203 veränderten die Zellzyklusverteilungsprofile. Nach 24 h erhöhte 1 mM HU den Anteil der MIA PaCa-2-Zellen in den G1- und S-Phasen auf 63 % beziehungsweise 27 %, was auf einen G1/S-Phasenarrest hinweist. Dies ging mit einer signifikanten Abnahme der G2/M-Phase Zellen einher. Die Verbindung 9a verstärkte die Akkumulation der HU-behandelten Zellen in der G1-Phase auf 68 %. In MA203+HU-behandelten Zellen stieg der G1-Anteil bis auf 77 %. Diese Daten zeigen, dass die Depletion von CHK1 in HU-behandelten PDAC-Zellen einen stärkeren G1-Arrest verursacht als die CHK1-Inhibition. Nach 24 h führten MA203 plus HU nicht zu einer Zunahme der SubG1-Fraktion in MIA PaCa-2-Zellen (Abbildung 8a). Somit sind die Reduktion von CHK1 und die

damit einhergehende DNA-Schadensinduktion durch MA203 in HU-behandelten Zellen (Abbildungen 3 und 4) nicht nur Konsequenzen der Zelltodinduktion.

Nach 48 h erhöhte HU den Anteil der MIA PaCa-2-Zellen in der SubG1-Phase signifikant auf 10 %, begleitet von einer moderaten Akkumulation in der G1- und einem Arrest in den S- und G2/M-Phasen (Abbildung 8a). Ein akuter HU-vermittelter S-Phasenarrest ist reversibel und aktiviert DNA-Replikationsursprünge, um die DNA-Replikation aufrechtzuerhalten. Eine verlängerte Inkubation mit HU blockiert jedoch die Zellzyklusprogression infolge von DNA-Schäden.^[15] Solche Zellen werden durch den ATR/CHK1-Signalweg vor Apoptose geschützt. Dieser Signalweg aktiviert den S-Phase Kontrollpunkt, um Replikationsgabeln zu stabilisieren,^[10] die Zellzyklusprogression zu hemmen und die Mitose zu verhindern.^[8,15] Weiter wird RRM2 über den Transkriptionsfaktor E2F1 positiv reguliert,^[42] und eine Erschöpfung des RPA-Pools durch exzessive Aktivierung der DNA-Replikationsursprünge wird von ATR verhindert.^[26] Sowohl MA203 als auch 9a erhöhten die Zahl der HU-behandelten Zellen in der G1-Phase und verhinderten deren Eintritt in die G2/M-Phase. Allerdings wurde die HU-induzierte Akkumulation von MIA PaCa-2-Zellen in der S-Phase durch MA203, nicht aber durch 9a, signifikant verhindert (Abbildung 8a). Dieses Ergebnis stimmt mit der stärkeren Repression von CDCA7 durch MA203+HU überein (Abbildung 7b). Zudem ist bekannt, dass CHK1-Inhibition aberrante CDK2-Aktivität steigern und so den proteasomalen Abbau von RRM2 über dessen Phosphorylierung antreibt.^[35] Wir beobachteten unter CHK1-Depletion mit MA203 eine signifikant schwächere Induktion von RRM2 als bei Hemmung von CHK1 (Abbildung 7b).

Die Hemmung der CHK1-Kinase (durch 9a) oder die Depletion von CHK1 (durch MA203) verstärkten beide die von HU-bewirkte DNA-Fragmentierung in MIA PaCa-2-Zellen. Bemerkenswerterweise lag der Anteil an MA203+HU-behandelten Zellen in der SubG1 Fraktion (23 %) signifikant höher als bei Behandlung mit 9a+HU (15 %) (Abbildung 8a). Dieser verstärkte Zelltod lässt sich durch unsere oben beschriebenen Befunde erklären. Auslösen von CHK1, Verstärkung des DNA-Replikationsstresses, Umwandlung von ssDNA-Brüchen in DSBs und Kollaps der DNA-Replikationsgabeln (Replikationskatastrophe), und fehlende DNA-Reparatur.

Wir verglichen dazu das apoptotische Potenzial von MA203 und 9a durch Annexin-V/PI-Doppelfärbung. Die kombinierte Behandlung mit MA203 und HU führte nach 48 h in MIA PaCa-2-Zellen zu einer signifikant höheren Induktion früher Apoptose (33 %) als 9a+HU (16 %). In MOLT-4-Zellen war die höhere synergistische Letalität von MA203 gegenüber 9a sowohl in der frühen als auch in der späten Apoptose nach 24 h erkennbar (Abbildung 8b).

Wir spekulierten, dass CHK1-Inhibition als auch CHK1-Elimination den intrinsischen Apoptoseweg verstärken, welcher den zentralen Zelltodmechanismus bei Chemotherapie-induziertem DNA-Replikationsstress/DNA-Schäden darstellt.^[43] Dieser Mechanismus wird über BCL2-Proteine, den Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und die nachfolgende Aktivierung von

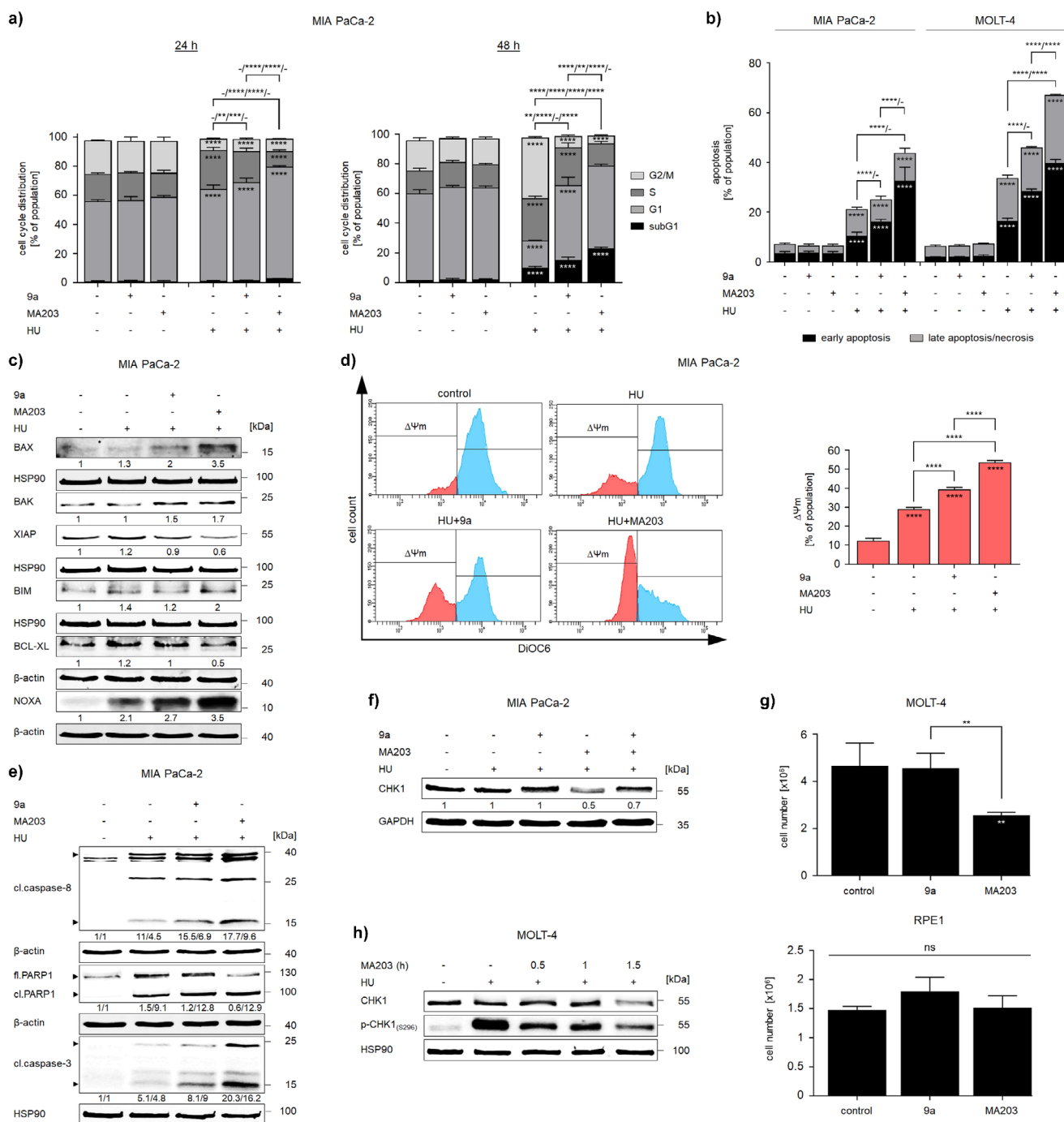


Abbildung 8. Potenz des CHK1-PROTAC MA203 im Vergleich zum Rabusertib-Analogon 9a. a) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm von MIA PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 24 h bzw. 48 h. Die Zellen wurden fixiert, mit PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Zellzyklusverteilung analysiert ($n = 3 \pm$ SD; Zweifaktor-ANOVA; Bonferroni-Mehrfachvergleich: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$). b) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramme von MIA PaCa-2 und MOLT-4 Zellen, die mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 48 h bzw. 24 h behandelt wurden. Die Zellen wurden mit Annexin-V/PI gefärbt und per Durchflusszytometrie auf die Induktion von Zelltod untersucht ($n = 3 \pm$ SD; Zweifaktor-ANOVA; Bonferroni-Mehrfachvergleich: **** $p \leq 0,0001$). c) Immunoblots aus Lysaten von MIA PaCa-2 Zellen, behandelt mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 24 h, zeigen BAX, BAK, XIAP, BIM, BCL-XL und NOXA; HSP90 und β -Actin dienen als unabhängige Ladekontrollen. d) Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) von DiOC6-gefärbten MIA PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 38 h. Links: Repräsentative Histogramme der Durchflusszytometrie; rechts: Dosis-Wirkungs-Balkendiagramm ($n = 2 \pm$ SD; einfaktorielle ANOVA; Bonferroni-Mehrfachvergleich: **** $p \leq 0,0001$). e) Immunoblots von Lysaten aus MIA PaCa-2 Zellen, behandelt mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 \pm 1 mM HU für 48 h, zeigen gespaltene Caspase-8, Volllänge und gespaltenes PARP1 sowie gespaltene Caspase-3; HSP90 und β -Actin, unabhängige Ladekontrollen. f) Immunoblots aus Lysaten von MIA PaCa-2 Zellen, die mit 2 μ M MA203+0,5 mM HU für 16 h \pm 10 μ M 9a für 17 h behandelt wurden, zeigen CHK1; GAPDH dient als Ladekontrolle. Zahlen unterhalb der

Caspasen vermittelt. BAX und BAK sind proapoptotische Effektorproteine, die bei Apoptoseinduktion an der äußeren Mitochondrienmembran oligomerisieren und deren Durchlässigkeit für die Freisetzung proapoptotischer Faktoren, hauptsächlich Cytochrom c, ermöglichen.^[44] Nach 24 h verstärkte die kombinierte Behandlung von MIA PaCa-2-Zellen mit HU und 9a oder MA203 die Expression von BAX und BAK signifikant stärker als die alleinige HU-Behandlung. Auffällig war eine stärkere Induktion von BAX in MA203+HU- (3,5-fach) gegenüber 9a+HU-behandelten Zellen (2-fach) (Abbildung 8c). Das Protein BIM wirkt als direkter Aktivator von BAX und BAK oder indem es die Apoptose hemmenden Proteine bindet und die Apoptose fördernde Effektoren freisetzen kann.^[44] In HU-behandelten Zellen erhöhte MA203, nicht aber 9a, die BIM-Expression um das Zweifache. Eine signifikant höhere Akkumulation des proapoptotischen NOXA-Proteins wurde nach Kombination von HU mit MA203 (3,5-fach) im Vergleich zu 9a (2,7-fach) festgestellt (Abbildung 8c). Diese Beobachtungen stimmen mit der beobachteten Apoptose und den proapoptotischen Funktionen von BIM und NOXA überein.^[45]

BCL2-Proteine, wie BCL-XL, unterdrücken den Zelltod, indem sie die Apoptose fördernden BCL2-Proteine binden und inhibieren.^[44] Ein weiteres die Apoptose bremsendes Protein ist der X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), der aktive Caspasen bindet und hemmt.^[46] Während 9a+HU nach 24 h die Expression dieser Proteine nicht reduzierte, senkte MA203+HU die Proteinspiegel von BCL-XL und XIAP signifikant auf 50–60 % (Abbildung 8c).

Wir untersuchten darüber hinaus den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotenzials ($\Delta\Psi_m$), welches ein frühes Ereignis der Apoptose darstellt.^[47] MIA PaCa-2-Zellen wurden zu einem früheren Zeitpunkt als 48 h behandelt, um die mitochondriale Schädigung vor Einsetzen der Apoptose zu erfassen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen induzierte 1 mM HU nach 38 h eine signifikante mitochondriale Schädigung in bis zu 29 % der Zellpopulation. In 9a+HU-behandelten Zellen war der Verlust des Membranpotenzials stärker (39 %). In MA203+HU-behandelten Zellen wurde ein noch deutlicherer Anstieg des Anteils geschädigter Zellen (54 %) beobachtet (Abbildung 8d).

Caspasen sind eine Familie konservierter, cysteinabhängiger Endoproteasen, die in Initiator- und Effektor-Caspasen eingeteilt werden. Die Initiator-Pro-Caspase-9 wird an das sogenannte Apoptosom rekrutiert, das durch die Bindung von Cytochrom c (freigesetzt durch die mitochondriale Perforierung) an den Apoptose-Peptidase-aktivierenden Faktor 1 (APAF1) gebildet wird. Apoptosomen aktivieren die Umwandlung von Pro-Caspase-9 zu Caspase-9, welche wiederum die Effektor-Caspasen-3 und -7 aktiviert.^[48] Eine aktivierende Spaltung eines weiteren Initiators, Caspase-8, kann den intrinsischen Apoptoseweg auslösen, indem das

die Apoptose fördernde BID-Protein gespalten wird, das nachfolgend BAX aktiviert.^[49] Nach 48 h konnten wir die gespaltenen Caspase-8-Fragmente p41/43 und p18 nach HU-Behandlung von MIA PaCa-2-Zellen nachweisen. Sowohl 9a als auch MA203 verstärkten die Caspase-8-Spaltung signifikant, wobei MA203 effektiver war (Abbildung 8e).

Extrinsische und intrinsische Apoptosewege kulminieren in der Aktivierung von Caspase-3 durch eine Abspaltung seiner Prodomäne. Die Caspase-3-vermittelte Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) ist ein maßgebliches Kennzeichen der Apoptose.^[48,50] Unsere Ergebnisse zeigten eine stärkere Prozessierung von Caspase-3, wenn HU mit MA203 kombiniert wurde, im Vergleich zu 9a. Das gespaltenen 89 kDa-PARP1-Fragment akkumulierte in 9a+HU- und MA203+HU-behandelten MIA PaCa-2-Zellen signifikant stärker als in mit HU behandelten Kontrollzellen. Allerdings führte nur MA203+HU zu einer Reduktion des ungeschnittenen PARP1 (Abbildung 8e).

Wir führten zudem ein Konkurrenzexperiment zwischen MA203 und 9a durch. Die Zugabe einer 5-fach höheren Konzentration von 9a im Vergleich zu MA203 schützte weitgehend die CHK1-Proteinspiegel vor einem durch MA203 vermittelten Abbau in mit 0,5 mM HU-behandelten MIA PaCa-2-Zellen nach 24 h (Abbildung 8f). Diese Daten belegen, dass MA203 und 9a dieselbe Bindungsstelle auf ihrem Zielprotein CHK1 teilen.

Wir adressierten zusätzlich die biologische Relevanz dieser Befunde. MIA PaCa-2-Zellen wurden mit 0,5 mM HU und entweder 2 μ M MA203, 10 μ M 9a oder deren Kombination behandelt. Ein 5-facher Überschuss an 9a war notwendig, um Apoptose in gleichem Maße zu induzieren wie mit 2 μ M MA203. Auffälligerweise führte die kombinierte Behandlung von MA203 und 9a nach 48 h nicht zu einem additiven apoptotischen Effekt (Abbildung S8). Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur den überlegenen Effekt der CHK1-Elimination gegenüber der CHK1-Inhibition (Abbildung 8b), sondern unterstützt, konsistent mit Abbildung 7, dass MA203 neuartige Funktionen von CHK1 offenbart, die sich nicht allein durch eine stärkere Hemmung erklären.

Die rasche Proliferation von Tumorzellen geht oft mit einem niedrigen, aber konstitutiven Niveau an DNA-Replikationsstress einher. Deshalb könnten solche Zellen besonders sensitiv gegenüber MA203 sein. Um dies zu klären, evaluierten wir, ob MA203 als Einzelwirkstoff Leukämiezellen eliminieren kann. Eine siebentägige Behandlung mit 2 μ M MA203, nicht aber mit 9a, verlangsamte die Proliferation von MOLT-4-Zellen. Bemerkenswerterweise hemmte eine solche Behandlung das Wachstum nicht-tumorer RPE1-Zellen nicht (Abbildung 8g). Diese Daten stimmen mit der Abnahme von CHK1 durch MA203 in MOLT-4-Zellen überein (Abbildungen 3b und 4b). Solche Ergebnisse decken sich

Proteinsignale repräsentieren densitometrische Werte, normalisiert auf die jeweilige Ladekontrolle; unbehandelte Zellen wurden auf 1,0 gesetzt (n = 2). g) Dosis-Wirkungs-Balkendiagramme zur Zellzahlanalyse von MOLT-4 (oben) und RPE1 (unten) Zellen nach Behandlung mit 2 μ M 9a oder 2 μ M MA203 für 7 Tage (n = 4 \pm SD; einfaktorielles ANOVA; Bonferroni-Mehrfachvergleich: ** p \leq 0,01; ns = nicht signifikant). h) Immunoblots aus Lysaten von MOLT-4 Zellen, behandelt mit 1 mM HU für 1 h \pm 2 μ M MA203 für 0,5, 1 und 1,5 h, zeigen CHK1 und p-CHK1(S296); HSP90 dient als Ladekontrolle.

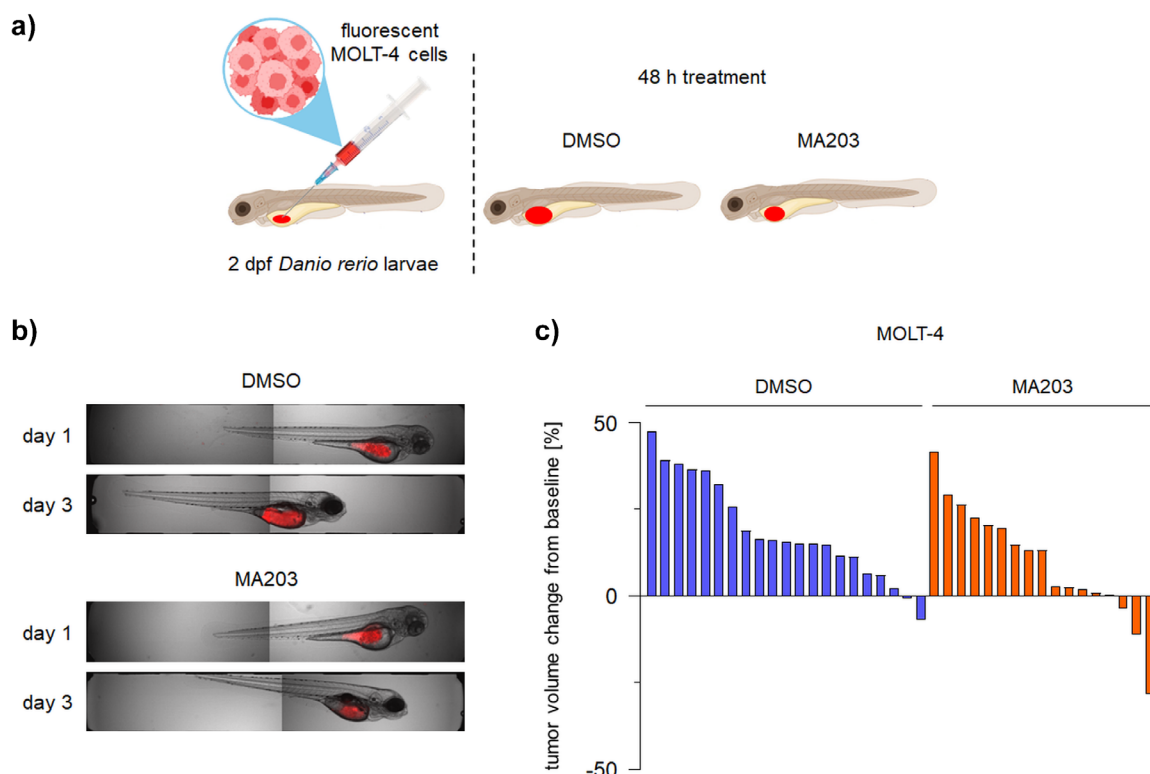


Abbildung 9. In vivo-Wirksamkeit von MA203. a) Schematische Darstellung des Versuchsmodells mit *Danio rerio* Larven 2 Tage nach der Befruchtung (dpf). b) Repräsentative Aufnahmen von *Danio rerio* Larven, die mit fluoreszenzmarkierten MOLT-4 Zellen (in rot) injiziert wurden. Die Larven wurden 24 h nach der Injektion der Tumorzellen (Tag 1) und vor der Behandlung sowie 48 h nach der Behandlung mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) oder 12 μ M MA203 (Tag 3) mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahmen sind überlagert dargestellt. c) Waterfall-Plot zeigt die prozentualen Veränderungen des Tumorzellvolumens im Vergleich zur Ausgangssituation (Tag 1, Beginn der Behandlung) für einzelne Larven mit MOLT-4 Xenotransplantaten bis Tag 3 nach 48 h Behandlung mit DMSO (links, $n = 21$ Larven) oder 12 μ M MA203 (rechts, $n = 17$ Larven). Jeder Balken repräsentiert ein einzelnes xenotransplantiertes Tier.

zudem mit Daten aus CRISPR-Cas9-basierten Knockout-Strategien, die CHK1 als für das Wachstum von Leukämiezellen unabdingbares Gen identifizieren (Abbildung 1d).

Immunoblots zur Bestimmung der basalen CHK1-Aktivität anhand der Autophosphorylierung an S296 zeigten eine niedrige Grundaktivität von CHK1 in MOLT-4-Zellen (Abbildung 8h). Ein solches basales Aktivierungsniveau von Checkpoint-Kinasen ist typisch für schnell proliferierende Tumorzellen.^[1,2] Diese Beobachtung kann erklären, weshalb MA203 als 9a/Rabuserib-Analogon, das bevorzugt aktives CHK1 blockiert,^[12] CHK1 auch in Abwesenheit von HU in solchen Zellen beseitigt (Abbildung 3f).

Die Fähigkeit von HU, die Phosphorylierung von CHK1 an S296 rasch zu erhöhen, erlaubte uns, die Abschwächung dieses Signals als Surrogatmarker für die zelluläre Aufnahmegeschwindigkeit von MA203 zu nutzen. Dazu führten wir ein Zeitverlaufsexperiment durch, bei dem MOLT-4-Zellen für 1 h mit 1 mM HU behandelt und anschließend in 30-min-Intervallen mit 2 μ M MA203 inkubiert wurden. Bereits nach 30 min war die HU-vermittelte Autophosphorylierung von CHK1 an S296 stark reduziert. Der Beginn der CHK1-Protein-Eliminierung wurde nach 90 min sichtbar (Abbildung 8h). Dies weist auf eine schnelle Aufnahme von MA203 in Leukämiezellen hin und stimmt mit Daten überein, die wir mit adhärenzen Tumorzellen erhoben haben (Abbildung 3c).

MA203 wirkt gegen humane Leukämiezellen in vivo

Die reduzierte Proliferation von MOLT-4-Zellen in Anwesenheit von MA203 (Abbildung 8g) motivierte uns, dessen Aktivität in vivo zu untersuchen. Zebrafischlarven (*Danio rerio*) stellen ein anerkanntes Modell für Toxizitätstests dar und werden zunehmend zur Analyse der biologischen Effekte von proteolytischen Substanzen auf das Tumorzellwachstum eingesetzt. Die Transparenz von *Danio rerio* Larven ermöglicht die direkte Beobachtung von Tumorzellmassen und deren Verteilung in vivo.^[51–55] Zudem weist *Danio rerio* nicht die Limitierungen von Mäusen (*Mus musculus*) oder anderen Nagern auf, die eine CRBN391I-Isoform exprimieren. Es ist bekannt, dass CRBN391I nicht wie humanes CRBN (CRBN391V) auf Thalidomid, Lenalidomid oder Pomalidomid reagiert.^[31,56] (Anmerkung: Es sei auf den Contergan-Skandal verwiesen.)

Wir injizierten fluoreszenzmarkierte MOLT-4-Zellen in Zebrafischlarven, ließen Leukämiezellmassen anwachsen und gaben 12 μ M MA203 oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle für zwei Tage in das Nährmedium (Abbildung 9a). Diese MA203-Konzentration erwies sich als sicher und führte zu keinerlei Anzeichen von Toxizität (Larvenkrümmung, Vergrößerung des Perikards oder morphologische Veränderungen wurden nicht erkennbar) (Abbildung S9).

Die Untersuchung der Effekte auf die transplantierten MOLT-4-Zellen zeigte eine ausgeprägte antileukämische Aktivität von MA203 als Einzelwirkstoff. Abbildung 9b veranschaulicht Beispiele von Larven mit Tumorzellen. Die Analyse von 21 mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten und 17 mit MA203 behandelten Larven ergab, dass die Zunahme der Tumorlast in der MA203-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um etwa 50 % reduziert war (Abbildung 9c). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MA203 in vivo gegen MOLT-4-Zellen aktiv ist – ohne in diesem Modell nachweisbare Nebenwirkungen hervorzurufen.

Schlussfolgerung

Der induzierte proteasomale Abbau von CHK1 durch das bona fide PROTAC MA203 ist einer kompetitiven Kinasehemmung von CHK1 in Tumorzellen überlegen, sowohl hinsichtlich der Störung der Zellzykluskontrolle als auch der Induktion von Apoptose unter Chemotherapeutika-induziertem DNA-Replikationsstress. Die Fähigkeit von MA203, von der Kinaseaktivität des CHK1 abhängige als auch davon unabhängige Funktionen von CHK1 zu beeinträchtigen, minimiert die ATR/ATM-vermittelte Kontrolle von DNA-Replikationsstress. Zudem destabilisiert CHK1 Schlüsselfaktoren, die die Integrität von DNA-Replikationsgabeln sichern. Wir schlagen die Bezeichnung **CHEKTAC-100** für diesen innovativen pharmakologischen Wirkstoff vor, der es uns ermöglicht hat, neuartige mechanistische Einsichten in das für viele physiologische Funktionen zentralen Proteins CHK1 zu gewinnen.

Zusatzinformationen

Die Autoren haben in den zusätzlichen Informationen (SI) weitere Quellen angegeben. Diese sind: [4,27,57–82]

Danksagung

Die Arbeiten in der Gruppe von O.H.K. werden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) DFG KR2291/14-1, Projektnummer 469954457; KR2291/15-1, Projektnummer 495271833; KR2291/16-1, Projektnummer 496927074; KR2291/17-1, Projektnummer 502534123; KR2291/18-1, Projektnummer 528202295; sowie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Projekt-ID 393547839 – SFB 1361. Weitere Förderung erfolgte durch den DAAD (Ägypten/Deutschland), die Brigitteund Dr. Konstanze Wegener-Stiftung (Projekte 65/110), die DFG (Projekt-ID 318346496 – SFB1292 TP21N, M.P.R.), die Walter-Schulz-Stiftung, die José-Carreras-Leukämie-Stiftung (Projekt DJCLS 09 R/2024) sowie die Hector Stiftung. Die Arbeiten in der Gruppe von W.S. werden gefördert durch die DFG, Projektnummer 528202295, SI868/29-1; Projektnummer 495271833; SI868/26-1, Projektnummer 468534282; SI868/28-1 sowie durch die

Alexander von Humboldt-Stiftung, Projekt EGY 1191187. Die Proteomanalysen werden unterstützt durch die DFG, Projektnummer 524805621, welche das Orbitrap-Astral-System finanziert. Wir danken Prof. Dr. D. Krause (Mainz, Deutschland), Prof. Dr. F.-D. Böhmer und Prof. T. Heinzel (Jena, Deutschland) sowie Prof. Dr. G. Winter (Wien, Österreich) für die Bereitstellung von Zellen.

Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Schlüsselwörter: Cereblon • CHK1 • DNA-Replikationsstress • PROTAC • Tumorzellen

- [1] A. A. B. da Costa, D. Chowdhury, G. I. Shapiro, A. D. D'Andrea, P. A. Konstantinopoulos, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2023**, 22, 38–58.
- [2] D. Menolfi, S. Zha, *Cell Biosci.* **2020**, 10, 8.
- [3] Y.-W. Wang, L. Lan, M. Wang, J.-Y. Zhang, Y.-H. Gao, L. Shi, L.-P. Sun, *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 247, 115037.
- [4] A. M. Alfayomy, R. Ashry, A. G. Kansy, A.-C. Sarnow, F. Erdmann, M. Schmidt, O. H. Krämer, W. Sippl, *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, 267, 116167.
- [5] G. M. Burslem, B. E. Smith, A. C. Lai, S. Jaime-Figueroa, D. C. McQuaid, D. P. Bondeson, M. Toure, H. Dong, Y. Qian, J. Wang, *Cell Chem. Biol.* **2018**, 25, 67–77. e63.
- [6] B. Sun, W. Fiskus, Y. Qian, K. Rajapakshe, K. Raina, K. Coleman, A. Crew, A. Shen, D. Saenz, C. Mill, *Leukemia* **2018**, 32, 343–352.
- [7] D. Chirnomas, K. R. Hornberger, C. M. Crews, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2023**, 20, 265–278.
- [8] Z. Qiu, N. L. Oleinick, J. Zhang, *Radiotherapy and Oncology* **2018**, 126, 450–464.
- [9] F. Schuler, S. Afreen, C. Manzl, G. Häcker, M. Erlacher, A. Villunger, *EMBO Rep.* **2019**, 20, e47026.
- [10] R. Thompson, A. Eastman, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, 76, 358–369.
- [11] K. Jiang, M. Deng, W. Du, T. Liu, J. Li, Y. Zhou, *Medicine in Drug Discovery* **2024**, 100185.
- [12] F. Neizer-Ashun, R. Bhattacharya, *Cancer Letters* **2021**, 497, 202–211.
- [13] A. Di Tullio, K. Rouault-Pierre, A. Abarrategi, S. Mian, W. Grey, J. Gribben, A. Stewart, E. Blackwood, D. Bonnet, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1679.
- [14] C. King, H. Diaz, D. Barnard, D. Barda, D. Clawson, W. Blosser, K. Cox, S. Guo, M. Marshall, *Investigational New Drugs* **2014**, 32, 213–226.
- [15] M. W. Musiałek, D. Rybaczek, *Genes* **2021**, 12, 1096.

- [16] T. M. Nguyen, V. Srekanth, A. Deb, P. Kokkonda, P. K. Tiwari, K. A. Donovan, V. Shoba, S. K. Chaudhary, J. A. Mercer, S. Lai, *Nat. Chem.* **2024**, *16*, 218–228.
- [17] A. Patil, M. Manzano, E. Gottwein, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2018**, *132*, 577–586.
- [18] L. A. Parsels, Y. Qian, D. M. Tanska, M. Gross, L. Zhao, M. C. Hassan, S. Arumugarajah, J. D. Parsels, L. Hylander-Gans, D. M. Simeone, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3706–3715.
- [19] M. Dzulklo, M. Pons, A. Henke, G. Schneider, O. H. Krämer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **2020**, *1874*, 188453.
- [20] T. Tummala, A. S. Sevilla Uruchurtu, A. D. L. Cruz, K. E. Huntington, A. George, N. R. Liguori, L. Zhang, L. Zhou, A. E. Abbas, C. G. Azzoli, *Curr. Oncol.* **2023**, *30*, 9611–9626.
- [21] H. M. Kantarjian, C. D. DiNardo, T. M. Kadia, N. G. Daver, J. K. Altman, E. M. Stein, E. Jabbour, C. A. Schiffer, A. Lang, F. Ravandi, *Ca-Cancer J. Clin.* **2025**, *75*, 46–67.
- [22] D. Tomizawa, *International Journal of Hematology* **2023**, *117*, 162–172.
- [23] B. Tomic, T. Smoljo, H. Lalic, V. Dembitz, J. Batinic, D. Batinic, A. Bedalov, D. Visnjic, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 11344.
- [24] M. D. Garrett, I. Collins, *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 308–316.
- [25] L. Zhou, Y. Jiang, Q. Luo, L. Li, L. Jia, *Molecular Cancer* **2019**, *18*, 1–11.
- [26] L. Toledo, K. J. Neelsen, J. Lukas, *Mol. Cell* **2017**, *66*, 735–749.
- [27] A. G. Kansy, R. Ashry, A. H. M. Mustafa, A. M. Alfayomy, M. P. Radsak, Y. Zeyn, M. Bros, W. Sippl, O. H. Krämer, *Mol. Oncol.* **2024**, *18*, 1958–1965.
- [28] P. L. Olive, J. P. Banáth, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 23–29.
- [29] A. Del Prete, V. Salvi, A. Soriani, M. Laffranchi, F. Sozio, D. Bosio, S. Sozzani, *Cell Mol. Immunol.* **2023**, *20*, 432–447.
- [30] R. Chaudhary, R. J. Slebos, F. Song, K. P. McCleary-Sharpe, J. Masannat, A. C. Tan, X. Wang, N. Amaladas, W. Wu, G. E. Hall, *Mol. Carcinog.* **2021**, *60*, 138–150.
- [31] E. C. Fink, M. McConkey, D. N. Adams, S. D. Haldar, J. A. Kennedy, A. A. Guirguis, N. D. Udeshi, D. Mani, M. Chen, B. Liddicoat, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2018**, *132*, 1535–1544.
- [32] H. Li, Y. Weng, S. Wang, F. Wang, Y. Wang, P. Kong, L. Zhang, C. Cheng, H. Cui, E. Xu, *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 734655.
- [33] H. Liu, H. Zhang, X. Liu, W. Guo, Q. Liu, L. Chen, J. Pang, X. Liu, R. Li, W.-M. Tong, *Cancer Letters* **2023**, *555*, 216040.
- [34] A. M. Mas, E. Goñi, I. Ruiz de Los Mozos, A. Arcas, L. Statello, J. González, L. Blázquez, W. T. C. Lee, D. Gupta, Á. Sejas, *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 4447.
- [35] S. L. Koppenhafer, K. L. Goss, W. W. Terry, D. J. Gordon, *Mol. Cancer Res.* **2020**, *18*, 91–104.
- [36] K. Kehrli, M. Phelps, P. Lazarchuk, E. Chen, R. Monnat, J. M. Sidorova, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 24487–24503.
- [37] G. Basile, G. Leuzzi, P. Pichierri, A. Franchitto, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 12628–12639.
- [38] D. K. Orren, A. Machwe, *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8300.
- [39] K. Futami, Y. Furuichi, *Front. Genet.* **2015**, *5*, 441.
- [40] P. Pichierri, F. Ammazalorso, M. Bignami, A. Franchitto, *Aging (Albany NY)* **2011**, *3*, 311.
- [41] X. Zhu, X.-Y. Zheng, P. Gong, X. Xu, *Biochem. Soc. Trans.* **2022**, *50*, 1471–1480.
- [42] Y.-W. Zhang, T. L. Jones, S. E. Martin, N. J. Caplen, Y. Pommier, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18085–18095.
- [43] D. Westaby, J. M. Jimenez-Vacas, A. Padilha, A. Varkaris, S. P. Balk, J. S. de Bono, A. Sharp, *Cancers* **2021**, *14*, 51.
- [44] A. Peña-Blanco, A. J. García-Sáez, *The FEBS Journal* **2018**, *285*, 416–431.
- [45] P. E. Czabotar, E. F. Lee, M. F. van Delft, C. L. Day, B. J. Smith, D. C. Huang, W. D. Fairlie, M. G. Hinds, P. M. Colman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 6217–6222.
- [46] A. K. Chaudhary, N. Yadav, T. A. Bhat, J. O'Malley, S. Kumar, D. Chandra, *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 38–47.
- [47] M. Pons, C. M. Reichardt, D. Hennig, A. Nathan, N. Kiweler, C. Stocking, C. Wichmann, M. Christmann, F. Butter, S. Reichardt, *Arch. Toxicol.* **2018**, *92*, 2119–2135.
- [48] N. Van Opdenbosch, M. Lamkanfi, *Immunity* **2019**, *50*, 1352–1364.
- [49] P. Orning, E. Lien, *Journal of Leucocyte Biology* **2021**, *109*, 121–141.
- [50] Q. Chen, K. Ma, X. Liu, S.-H. Chen, P. Li, Y. Yu, A. K. Leung, X. Yu, *Cell Discov.* **2022**, *8*, 3.
- [51] Y. Jiang, Z. Su, J. Zheng, C.-H. Hsu, Y. Chen, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* **2025**, *26*, 613–632.
- [52] S. Parthasarathy, S. H. Aly, S. V. Tharumasivam, D. Siva, G. Krishnasamy, A. Chavaan, M. El-Shazly, *Toxicology Research* **2025**, *14*, tfaf095.
- [53] M. Halilovic, M. Abdelsalam, J. Zabkiewicz, M. Lazenby, C. Alvares, M. Schmidt, W. Brenner, S. Najafi, I. Oehme, C. Hieber, *Leukemia* **2024**, *38*, 2561–2572.
- [54] K. T. Samarasinghe, S. Jaime-Figueroa, M. Burgess, D. A. Nalawansa, K. Dai, Z. Hu, A. Bebenek, S. A. Holley, C. M. Crews, *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 648–661. e645.
- [55] C. Huang, C. Liang, T. Sadhukhan, S. Banerjee, Z. Fan, T. Li, Z. Zhu, P. Zhang, K. Raghavachari, H. Huang, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 9560–9565.
- [56] F. Pichiorri, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **2018**, *132*, 1470–1471.
- [57] Schrödinger Release 2021-4: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2021**.
- [58] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 221–234.
- [59] J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye, J. R. Greenwood, M. R. Timlin, M. Uchimaya, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2007**, *21*, 681–691.
- [60] C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi, W. Chen, L. Wang, W. Damm, G. A. Ross, M. K. Dahlgren, E. Russell, C. D. Von Bargen, *J. Chem. Theory Comput.* **2021**, *17*, 4291–4300.
- [61] Schrödinger Release 2021-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
- [62] K. S. Watts, P. Dalal, R. B. Murphy, W. Sherman, R. A. Friesner, J. C. Shelley, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 534–546.
- [63] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.
- [64] Schrödinger Release 2021-4: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2021**.
- [65] Y. Gao, S. P. Davies, M. Augustin, A. Woodward, U. A. Patel, R. Kovelman, K. J. Harvey, *Biochem. J.* **2013**, *451*, 313–328.
- [66] C. Hieber, A.-H. M. Mustafa, S. Neuroth, S. Henninger, H.-P. Wollscheid, J. Zabkiewicz, M. Lazenby, C. Alvares, S. Mahboobi, F. Butter, *Biomed. Pharmacother.* **2024**, *177*, 117076.
- [67] R. Ashry, A.-H. M. Mustafa, K. Hausmann, M. Linnebacher, S. Strand, W. Sippl, M. Wirth, O. H. Krämer, *Cancers* **2023**, *15*, 3650.
- [68] M. Beyer, S. J. Henninger, P. S. Haehnel, A.-H. M. Mustafa, E. Gurdal, B. Schubert, M. Christmann, A. Sellmer, S. Mahboobi, S. Drube, *Cell Chem. Biol.* **2022**, *29*, 398–411.e394.
- [69] A. Göder, C. Emmerich, T. Nikolova, N. Kiweler, M. Schreiber, T. Kühl, D. Imhof, M. Christmann, T. Heinzel, G. Schneider, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 764.
- [70] M. Pons, G. Nagel, Y. Zeyn, M. Beyer, T. Laguna, T. Brachetti, A. Sellmer, S. Mahboobi, R. Conradi, F. Butter, *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation* **2019**, *36*, 277–288.

- [71] C. S. Hughes, S. Moggridge, T. Müller, P. H. Sorensen, G. B. Morin, J. Krijgsveld, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 68–85.
- [72] J. Rappsilber, Y. Ishihama, M. Mann, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 663–670.
- [73] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372.
- [74] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R. A. Scheltema, J. V. Olsen, M. Mann, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 1794–1805.
- [75] J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Luber, I. Paron, N. Nagaraj, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2513–2526.
- [76] B. Phipson, S. Lee, I. J. Majewski, W. S. Alexander, G. K. Smyth, *The Annals of Applied Statistics* **2016**, *10*, 946.
- [77] Y. Benjamini, Y. Hochberg, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **2018**, *57*, 289–300.
- [78] J. K. Wrobel, S. Najafi, S. Ayhan, C. Gatzweiler, D. Krunić, J. Ridinger, T. Milde, F. Westermann, H. Peterziel, B. Meder, *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 345.
- [79] Z. Chen, M. Wang, D. Wu, L. Zhao, H. Metwally, W. Jiang, Y. Wang, L. Bai, D. McEachern, J. Luo, *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 5351–5372.
- [80] C. Galdeano, M. S. Gadd, P. Soares, S. Scaffidi, I. Van Molle, I. Birced, S. Hewitt, D. M. Dias, A. Ciulli, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8657–8663.
- [81] J. Wei, J. Hu, L. Wang, L. Xie, M. S. Jin, X. Chen, J. Liu, J. Jin, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10897–10911.
- [82] X. Zhang, T. Zhao, M. Sun, P. Li, M. Lai, L. Xie, J. Chen, J. Ding, H. Xie, J. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *78*, 117153.

Manuskript erhalten: 07. Juli 2025

Überarbeitetes Manuskript erhalten: 05. September 2025

Manuskript akzeptiert: 08. September 2025

Endgültige Fassung online: 17. Oktober 2025