

Design, Synthese und Charakterisierung neuer SIRTUIN Inhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

Vorgelegt

von Frau Diana Kalbas

Gutachter: Prof. Dr. Mike Schutkowski
Prof. Dr. Wolfgang Sippl
Prof. Dr. Manfred Jung

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis..... | 3 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | 6 |
| 1. Einleitung..... | 7 |
| 1.1 Sirtuine allgemein..... | 8 |
| 1.2 Reaktionsmechanismus..... | 10 |
| 1.3 SIRTUIN 2..... | 12 |
| 1.4 SIRTUIN 5..... | 15 |
| 1.5 Zielstellung..... | 17 |
| 2. Material und Methoden..... | 18 |
| 2.1 Materialien..... | 18 |
| 2.1.1 Peptid-Derivate..... | 18 |
| 2.1.2 Puffer..... | 19 |
| 2.1.3 Geräte..... | 19 |
| 2.2 Methoden – Peptidsynthese..... | 20 |
| 2.2.1 Generelle Methoden..... | 20 |
| 2.2.2 Festphasenpeptidsynthese..... | 20 |
| 2.2.3 (<i>S</i>)-2-Hydroxysuccinylsäure 1-(4-Methoxybenzyl)ester (b)..... | 21 |
| 2.2.4 (<i>S</i>)-2-(2-Mercapto)succinylsäure 1-(4-Methoxybenzyl)ester (d)..... | 22 |
| 2.2.5 Generelle Herstellung der Maleinsäure Derivate S5i-1 bis S5i-38..... | 22 |
| 2.2.6 Synthese von 2-Methyl 2-(2-Naphthylmercapto)succinylanhydrid (Marat Meleshin)..... | 23 |
| 2.2.7 Genereller Syntheseprozess der substituierten (<i>R/S</i>)-3-(aryl(oder benzyl)mercapto)-butyryl derivative S2i-a-c, S2i-1-11, S2i-KK-1, S2i-KT-1, S2i-K-1, S2i-BT-1, S2i-BT-11 und S2i-CF-1 (Marat Meleshin)..... | 23 |
| 2.2.8 Genereller Sytheseprozess der substituierten (<i>R/S</i>)-3-(arylmercapto)-nonanoyl (oder hexadecanoyl) derivative S2i-12-14, S2i-KK-14, S2i-BT-12, S2i-CF-12 und S2i-CF-12 (Marat Meleshin)..... | 24 |
| 2.2.9 Synthese des (<i>S</i>)-3-(3,4-dichlorophenylmercapto)-butyryl derivat S2i-1(<i>S</i>) (Marat Meleshin)..... | 24 |
| 2.2.10 Genereller Syntheseprozess für die (<i>R/S</i>)-3-(arylmercapto)-3-arylpropionyl) Peptid-Derivate S2i-c-h (Marat Meleshin)..... | 25 |
| 2.2.11 Generelle Synthese von Acryl-, Crotonsäure- und 3-Methylcrotonsäure-HFIP-Estern (Marat Meleshin)..... | 25 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.12 Generelle Synthese von (<i>R/S</i>)-3-(<i>n</i> -Dodecylthio)propionyl(butyroyl)-Derivaten SD-1-10 (Marat Meleshin) | 25 |
| 2.2.13 Synthese des Phytanoylderivats SD-7 (Marat Meleshin) | 26 |
| 2.2.14 Generelle Abspaltung der Peptid- und Lysin-Derivate | 26 |
| 2.3 Methoden – Messverfahren..... | 26 |
| 2.3.1 HPLC Substrat Assay..... | 26 |
| 2.3.2 HPLC-Inhibition Assay | 27 |
| 2.3.3 NAD ⁺ prä-inkubations-experiment..... | 27 |
| 2.3.4 Fluoreszenz Inhibition Assay | 27 |
| 2.3.5 Trypsininhibierung | 29 |
| 2.3.6 <i>Microscale</i> Thermophorese (MST)..... | 29 |
| 2.3.7 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (surface plasmon resonance spectroscopy = SPR)..... | 30 |
| 2.3.8 Thermostabilität (Sandra Liebscher) | 31 |
| 2.4 Methoden – Biologische Verfahren | 32 |
| 2.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen (Sandra Liebscher) .. | 32 |
| 2.4.2 <i>Affinity pull down</i> Experiment (Sandra Liebscher) | 32 |
| 2.4.3 Stabilität im humanen Serum | 33 |
| 2.5 Methoden – Kristallstrukturanalyse (Kooperation mit Ag Steegborn, Heidelberg)..... | 33 |
| 2.6 Docking-Studien | 34 |
| 2.6.1 SIRT5 (Kooperation mit AG Sippl)..... | 34 |
| 2.6.2 Docking Studien. SIRT2(Kooperation mit AG Sippl)..... | 34 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 35 |
| 3.1 Peptid-Derivate mit inhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT5..... | 35 |
| 3.2 Peptid-Derivate mit inhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT2..... | 44 |
| 3.3 Peptid-Derivate mit pseudoinhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT2..... | 55 |
| 4. Zusammenfassung und Ausblick | 63 |
| 5. Referenzen | 67 |
| 6. Anhang..... | 74 |
| MTPR Messungen..... | 74 |
| IC ₅₀ Messungen SIRT5 | 74 |
| K _i Messungen SIRT5..... | 84 |
| IC ₅₀ Messungen SIRT2 | 91 |
| K _i Messungen SIRT2..... | 97 |
| IC ₅₀ Messungen Der SD-Peptid-Derivate gegen SIRT2 und SIRT3 | 124 |
| HPLC Messungen | 130 |

| | |
|--|-----|
| 24h Stabilitäts- und Substrattests | 130 |
| Kinetiken | 134 |
| IC50 Messungen | 136 |
| MST Messungen | 144 |
| <i>SPR</i> Messungen | 159 |
| Biologische Messungen | 162 |
| Kristalldaten | 167 |
| LC-MC-Läufe | 169 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------|---|------------------|---|
| DMAP | 4-Dimethylaminopyridin | HDAC | Histondeacetylase |
| Abz | 2-Aminobenzoyl | IC50 | halbe inhibitorische Konzentration |
| ADP | Adenosindiphosphat | kcat | Wechselzahl |
| AGK2 | 2-Cyano-3-[5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furyl]-N-5-quinolinylacrylamide | kcat/KM | katalytische Effizienz |
| AS | Aminosäure | Ki | Inhibitorkonstante |
| BRCA1 | <i>breast cancer 1</i> | KM | Michaelis-Menten-Konstante |
| BubR1 | <i>budding uninhibited by benzimidazole-related 1</i> | MCF-1 | Michigan Cancer Foundation 1 |
| Bz | Benzoyl | MS | Massenspektrometrie |
| CoA | Coenzym A | NAD ⁺ | Nikotinamidadenindinukleotid |
| CPS1 | Carbamoylphosphat Synthetase 1 | NAM | Nikotinamid |
| FdL | Fluor-de-Lys [®] | NF-κB | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| FOXO | <i>forkhead box O</i> | TSucc | Thiosuccinyl |
| FRET | Förster Resonanz Energie Transfer | Tub | α-Tubulin |
| GDH | Glutamatdehydrogenase | Y(NO2) | 3-Nitrotyrosin |
| H 1-4 | Histon H 1-4 | zSirt5 | Sirtuin 5 aus Zebrafisch |
| H1299 | <i>human non-small cell lung carcinoma cell line 1299</i> | TNFα | Tumornekrosefaktor α |
| pdb | Proteindatenbank | TMyr | Thiomyristoyl |
| PDH | Pyruvatdehydrogenase | SirReal2 | <i>sirtuin rearranging ligand 2</i> |
| PTM | posttranslationale Modifikation | SIRT | humanes Sirtuin |
| Sir2 | <i>silent information regulator 2</i> | TAc | Thioacetyl |
| | | TAMRA | Tetramethylrhodamin-6-carbonsäure |

Die verwendeten Drei- und Einbuchstaben-Codes der Aminosäuren entsprechen den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur. [1]

1. Einleitung

Histone sind eine hochkonservierte Klasse von basischen Kernproteinen, die einen hohen Gehalt an Lysin und Arginin aufweisen. Diese positiven Aminosäuren (AS), sorgen nicht nur für die Verbindung mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA, sondern sind auch regulatorisch an Genprozessen beteiligt. Dies geschieht durch posttranslationale Modifikationen, kurz PTMs genannt. Zu diesen PTMs gehören unter anderem Phosphorylierungen, Acylierungen, Mono-, Di- und Tri-methylierungen, Glykosylierung und noch viele weitere. [2–5] PTMs von Histonproteinen können die Zugänglichkeit der DNA für Protein/Proteinkomplexen oder aber die Kondensation zum Chromosom verbessern. Die Histonproteine werden in fünf Hauptklassen unterteilt, wobei H1 als „Linker“-Histon bezeichnet wird, weil er Kontakt zu den DNA-Abschnitten zwischen den Nucleosomen hat. Die Klassen H2A, H2B, H3 und H4 gehören zu den Kern-Histonen und lagern sich zuerst jeweils in Dimere und anschließend einem Oktamer zusammen. Aus diesem Oktamer ragen unstrukturierte N-terminale und zum Teil C-terminale Histonschwänze, die sehr gut zugänglich für Proteine und Proteinkomplexe sind. Viele PTMs von Lysinen und anderen Seitenketten sind an diesen Histonschwänzen lokalisiert und werden durch Enzyme katalysiert. Diese Enzyme unterteilen sich in Schreiber („writer“), Leser („epigenetic marks“) wie z.B. Methyltransferasen und Radierer („eraser“) (Abb. 1).

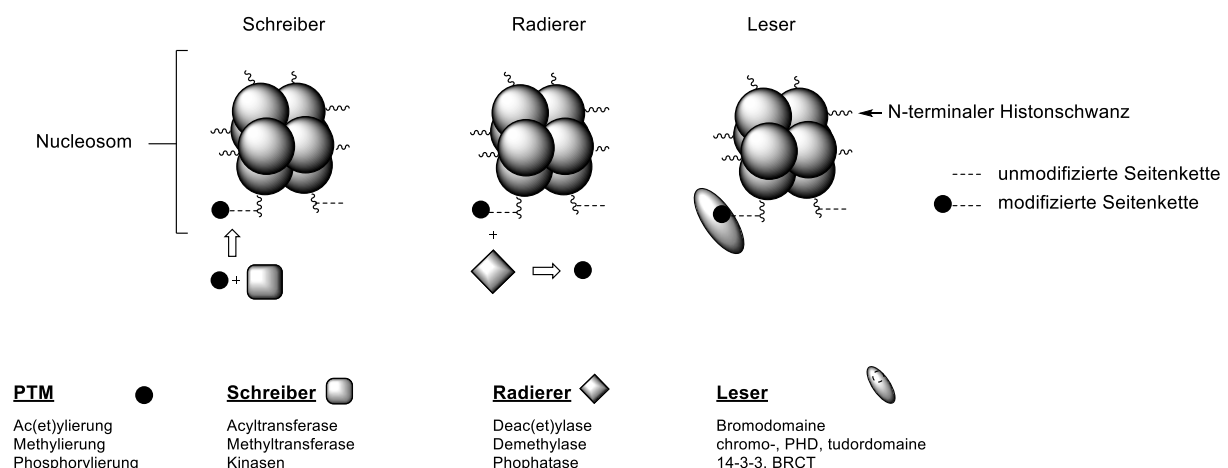


Abbildung 1: PTMs: Unterteilung der PTMs und ihre Funktionen

Zu den Schreibern zählen die sogenannten Histonacetyltransferasen [EC.2.3.1.48], kurz HATs [6] die hauptsächlich Lysine acetylieren, wodurch die Seitenkette nicht mehr positiv geladen ist. Das ermöglicht die Expression Histon-assoziiierter Gene, weil die Nucleosom-Konformation kurzzeitig geöffnet wird [7]

Die Gegenspieler der HATs sind die Histondeacetylasen [EC.3.5.1.98], kurz HDACs, die zu den *Erasern* zählen. Es sind 18 verschiedene HDACs bekannt, die nach Sequenz und Domäneneigenschaften in vier Klassen unterteilt werden können [8] (Abb. 2). Zur Klasse I gehören die HDAC 1,2,3 und 8, zur Klasse IIa die HDAC 4,5,7 und 9, zur Klasse IIb HDAC 6 und 10 und zur Klasse IV HDAC 11.

Die drei oben beschriebenen Klassen I, II und IV gehören zu den Zn^{2+} abhängigen HDACs die durch eine Zn^{2+} vermittelten Hydrolyse das Lysin deacetylieren. [9, 10] Dabei zeigen HDAC 1, 2, 3, 6 und 8 eine robuste Deacetylase-Aktivität, wobei HDAC 6 auch Deformylase-Aktivität zeigt. [11] Während die HDACs aus Klasse IIa nur schwach auf acetylierte Lysine reagieren, können sie effektive Trifluoroacetylierte Peptide hydrolysieren. [12] HDAC 11 acyliert spezifisch langkettige Acylreste wie Octanoyl-, Decanoyl, Dodecanoyl- und Myristoylreste. [13–15] HDAC der Klasse III bilden eine Sonderstellung, da sie nicht Zn^{2+} sondern NAD^+ abhängig sind. Bekannter sind diese HDAC unter dem Namen Sirtuine.

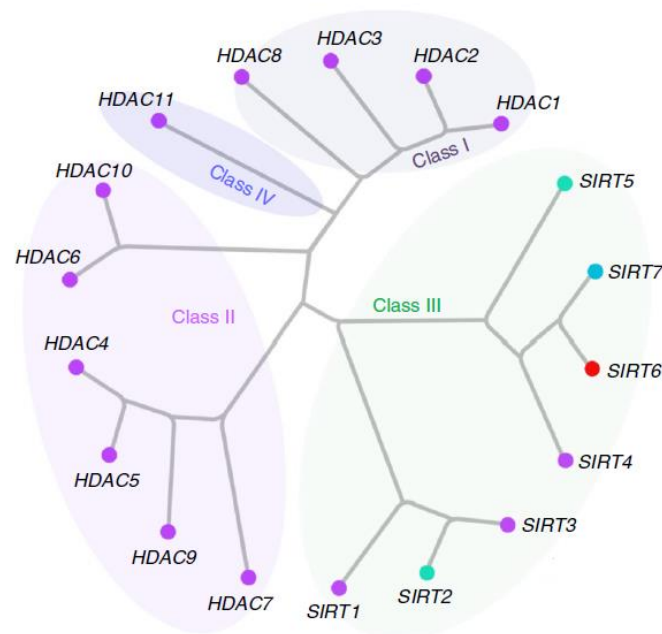


Abbildung 2: Klassifikation der HDACs aus Huang *et. al* 2018 – Unterteilung der HDACs und SIRTUINE in die vier verschiedenen Klassen I (HDAC1,2,3,8), II (HDAC4-7,9,10), III (SIRTUIN 1-7) und IV (HDAC11) [8]

1.1 Sirtuine allgemein

Sirtuine sind auch als *Sir2-like Proteins* bekannt und wurden erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* (Hefen) als *silent information regulator 2 protein* (Sir2) entdeckt. Neben Hefen sind Sirtuine ebenfalls in Bakterien, Würmern, Säugetieren und Menschen hochkonserviert und sind unter anderem für die zelluläre Regulation verantwortlich. Im Menschen gibt es sieben SIRTUIN [SIRT] Isomere mit unterschiedlicher Lokalisation und Funktion, welche in Abbildung 3 gezeigt werden. [16] Im Zellkern sind die SIRTUINE 1,6 und 7 lokalisiert, wobei SIRT1 auch im Zytoplasma vorkommt. SIRT2 befindet sich ebenfalls im Zytoplasma, während die SIRTUINE 3,4 und 5 im Mitochondrium vorkommen. [17] Sie regulieren unter anderem Zellprotektion, Zellalterung, Antwort auf zellulären Stress, Reparatur von DNA-Schäden, sowie Genomstabilität. Daher ist es nicht verwunderlich das SIRTUINE eine entscheidende Rolle bei altersbedingten Krankheiten- wie Diabetes, Adipositas, Krebs, Parkinson, Alzheimer oder kardiovaskulären Störungen spielen und für die Forschung relevant geworden sind. [18]

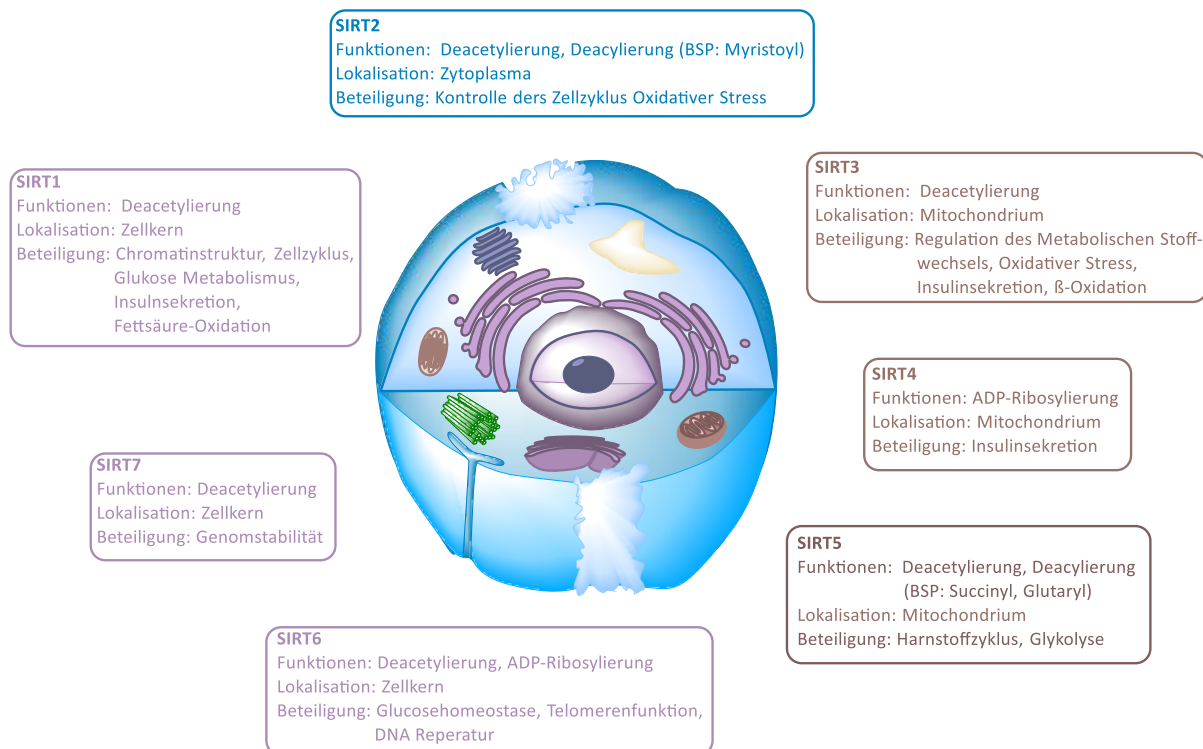


Abbildung 3: SIRT-Funktionen: Subzelluläre Lokalisation, Enzymklasse, beschriebene Enzymaktivität, Substrate/Zielproteine und Funktionen der sieben humanen Sirtuine (SIRT1-7) [16]

Aufgrund der Struktur ihrer Kerndomäne werden die sieben SIRTUIN Isoformen in vier Klassen mit unterschiedlicher Enzymaktivität unterteilt. [19, 20] Zur Klasse I gehören SIRT1, 2 und 3 die eine hohe Deacetylierungs-Aktivität aufweisen. Diese Deacetylierungs-Aktivität wurde zuerst bei den Histonproteinen H3-K9Ac und H4-K16Ac [21, 22] beschrieben. Neben der Deacetylase-Aktivität wurde auch eine schwache ADP-Ribosyltransferase-Aktivität beschrieben. [23, 24] SIRT1 deacetyliert auch Nicht-Histon-Proteine, wie den Tumorsuppressor p53, Peroxisom Proliferator-aktivierender Rezeptor Gamma (PPAR γ), Co-Aktivatoren-1 α (PGC-1 α) und *Forkhead box o*ther (FOXO) [25]. SIRT2 kann neben Acetyl- auch langkettige Acylreste, wie Butyryl-, Crotonyl- und Myristoylierung hydrolysieren. [26] SIRT3 reguliert den Acetylierungsstatus und damit die Aktivität vieler metabolischer Enzyme, wie Acetyl-CoA-Synthetase 2. [27] Jedoch wurden ebenfalls die Hydrolyse von Hexyl- und Palmotylresten bei SIRT3 detektiert. [26] Zur Klasse II gehört SIRT4 und katalysiert die ADP-Ribosylierung der Glutamatdehydrogenase (GDH). Die GDH wird inhibiert und SIRT4 beeinflusst damit die Insulinsekretion. [28] Einziger Vertreter der Klasse III ist SIRT5, welche eher eine höhere Desuccinyl- bzw. Deglutarylierung als Deacetylierung aufweist. [29] SIRT6 und 7 gehören zur letzten Klasse IV. SIRT6 zeigt eine gute Deacetylierung von Lysinen bei Histonprotein H3 (H3K9Ac, H3K18Ac, H3K27Ac). [30] Dadurch hat SIRT6 einen Einfluss auf die Genom- und Telomerstabilität und damit auf den Alterungsprozess. [31] Genau wie SIRT2 kann auch SIRT6 Myristoyl deacylieren. [32] SIRT7 ist bis jetzt am wenigsten erforscht, hat jedoch einen positiven Effekt auf kardiale Stressresistenz und beugt Apoptose in Mäusen vor. [33] Trotz der unterschiedlichen Funktionen der sieben SIRTUIN Isoformen verläuft der Reaktionsmechanismus der Deacetyl- bzw. Deacylierung vermutlich nach einer bestimmten Reihenfolge.

1.2 Reaktionsmechanismus

Sirtuine deacetylieren Acylgruppen an der Epsilon Aminogruppe des Lysins unter Verbrauch von NAD⁺. Der genaue Reaktionsmechanismus wird in Abbildung 4 mit einem (de)acetylierten Lysin dargestellt und ist auf langkettige Acylreste übertragbar.

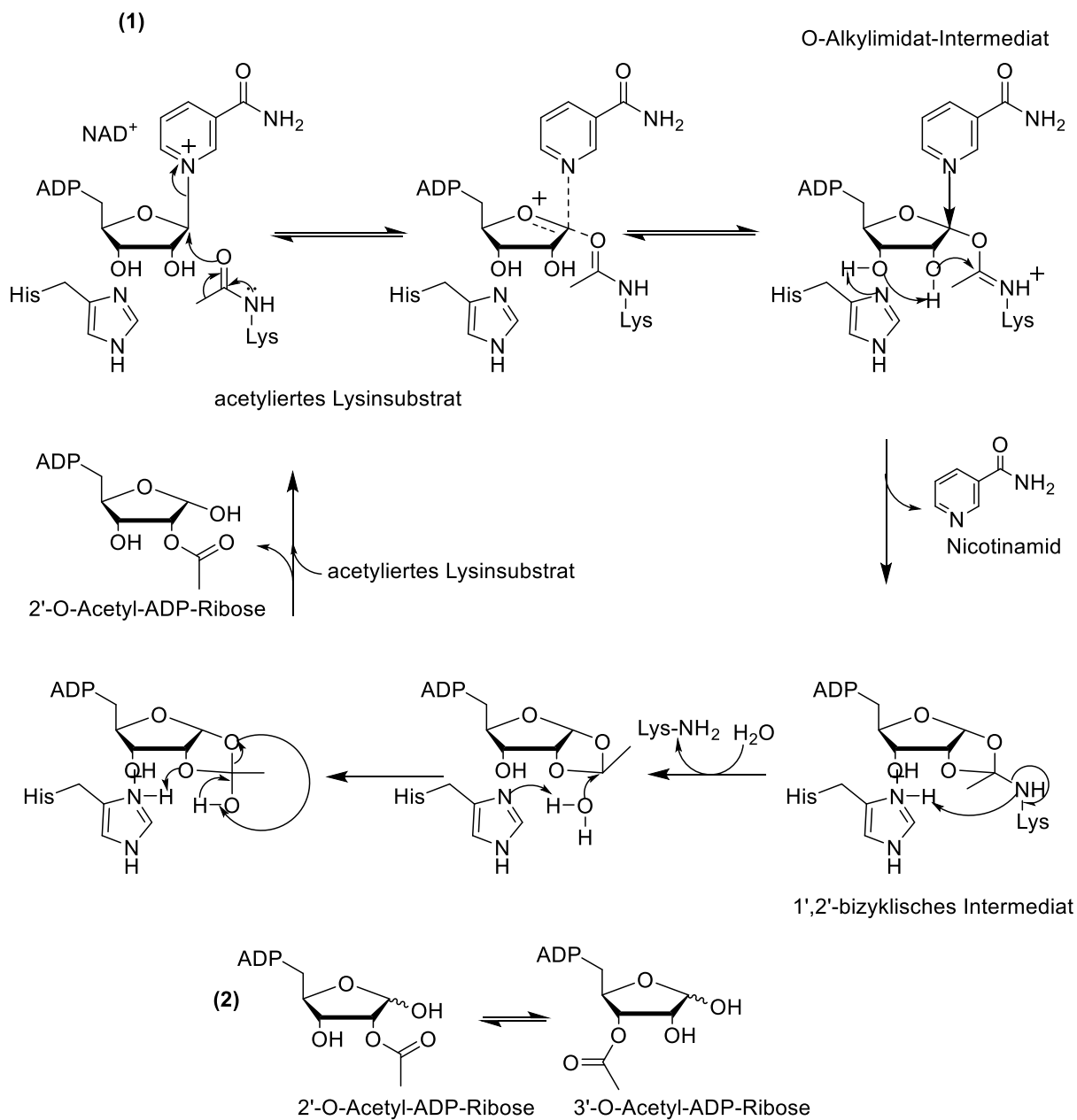


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus der SIRTUINE – [1] Schrittweiser Mechanismus von SIRTUINEN am Beispiel einer der Deacetylierung. [2] Spontanes Gleichgewicht von 2'-O-Acetyl-ADPR und 3'-O-Acetyl-ADPR.

In dem bis heute bestehenden Reaktionsmechanismus aus Sauve et al. (2010) bindet das Co-substrat NAD^+ nach dem Substrat-Peptid im katalytischen Zentrum. [34] Als erstes erfolgt eine ADP-Ribosylierung des Substrat-Peptids und bildet einen Übergangszustand, bevor es sich zum 1'-O-Alkylimidat-Intermediat formiert. Es ist nicht genau geklärt, ob es sich bei diesem Schritt um eine $\text{S}_{\text{N}}1$ -Reaktion handelt, wobei eine vollständige Dissoziation von NAM ein Enzym stabilisierendes Oxacarbeniumion bildet und durch den nukleophilen Angriff des Substrat-Peptids kollabiert [35], oder einem $\text{S}_{\text{N}}2$ ähnlichen Mechanismus der durch ein pentakoordiniertes Intermediat im Übergangszustand charakterisiert ist. [36] Im nächsten Schritt wird der Kohlenstoff des Alkylimidat nukleophil von der 2'-Hydroxygruppe der ADP-Ribose (ADPR) angegriffen, welches über ein konserviertes Histidin aktiviert wurde. Bei zu hohen NAM-Konzentrationen erfolgt ein nukleophiler Angriff des freigesetzten NAMs in β -Richtung auf das anomere Kohlenstoffatom des Intermediats und führt zur Rückreaktion zum NAD^+ . Dieser Inhibierungsschritt dient zur Regulierung der Sirtuinaktivität [37] Nach der Deacetylierung des Lysins, wird dieses unter Bildung von 2'-O-Acetyl-ADPR abgespalten, indem H_2O das Kohlenstoffatom des Acetylrests nukleophil angreift. Zum Schluss bildet sich ein spontanes Gleichgewicht zwischen 2'-O-Acetyl-ADPR und 3'-O-Acetyl-ADPR.

SIRT1 bis 7 sind im katalytischen Zentrum stark konserviert, und differenzieren sich im N- und C-Terminus. Allgemein besteht der Kernbereich aus ca. 275 AS die sich zusammensetzen aus der größeren Rossmann-Domäne und der variablen, kleineren Zn^{2+} -bindenden Domäne. Die beiden Domänen werden über vier *loops* (Schleifen) miteinander verbunden und bilden das aktive Zentrum. [38] Die Rossmann-Domäne ist ein klassisches NAD^+ Strukturmotiv, welches aus sechs parallelen β -Faltblättern besteht, die, je nach SIRTUIN Isoform, von mehreren α -Helices umgeben sind.

1.3 SIRTUIN 2

Die Struktur von SIRT2 besteht aus der bereits beschriebenen, größeren Rossmann-Domäne (AS 55-91, 146-186, 241-356) und einer kleinen, Zn^{2+} -bindenden Domäne (AS 92-145, 187-240). [39] Teng et al. (2015) zeigte, dass SIRT2 auch verschiedene Peptide demyristoylieren kann. Die Demyristoylierung von H3K9 zeigte einen 5-fach höheren k_{cat}/K_M als deren Deacetylierung. Für ein besseres Verständnis wurde SIRT2 mit dem Thiomyristoyl Peptid bhjh-tm1 kristallisiert und mit dem Apoenzym verglichen. Die Zn^{2+} -bindende Domäne verschiebt sich um 10Å zur Bindetasche und die hydrophoben AS (z.B. Ile₉₃, Phe₁₄₃, Ile₁₆₆) der Rossmann-Domäne und die hydrophoben AS (z.B. Phe₁₃₁, Leu₁₃₈, Phe₁₃₄ der Zn^{2+} -bindenden Domäne formen eine „Myristoyltasche“. [40]

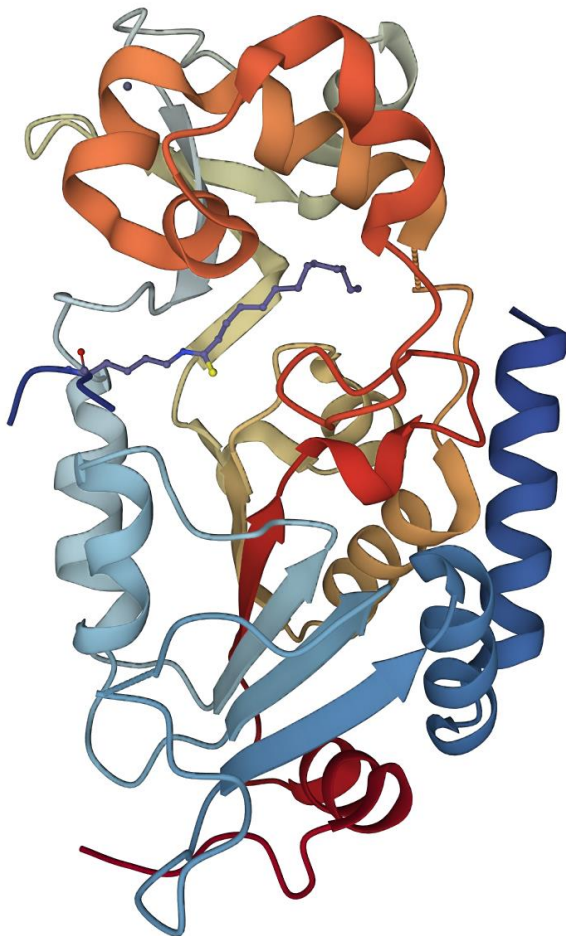


Abbildung 5: Röntgenkristallstruktur 4R8M SIRT2 mit TM (Dunkelblau), was im aktiven Zentrum und dem hydrophoben Tunnel von SIRT2 bindet. – erstellt über Uniprot 3D-Struktur viewer

SIRT2 ist primär im Zytoplasma lokalisiert, wandert aber während des G2/M Phasenübergangs in den Nukleus und deacetyliert das Histonprotein H4K16ac, wodurch die Chromatinkondensation während der Metaphase moduliert wird. [41] Außerdem wurde beschrieben, dass die SIRT2 Konzentration während des Zellzyklus variiert und in der Mitose erhöht wird, weswegen es eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. [42] Neben Histonproteinen deacetyliert SIRT2 auch eine Reihe an Nicht-Histon-Proteinen wie p300 zur Regulation der p300 Autoacetylation [43] p65 zur Regulation der NF- κ B abhängigen Genexpression [44] oder α -Tubulin im Mikrotubulus. SIRT2 deacetyliert das α -Tubulin am Lysin 40 zur Differenzierung des Zytoskeletts. [45]

Bei der Regulation des Zellzyklus gilt SIRT2 als mitotischer „Check-point“ und spielt ebenfalls bei der Tumorgenese eine Rolle. [42] SIRT2 Inhibitoren NCO-90/141 induzieren den Zelltod in leukämischen Zelllinien, wie HTLV-1-transformierten T-Zellen. [46] Außerdem wurde gezeigt, dass die siRNA induzierte *down*-Regulation von SIRT2 zur Apoptose in Glioma-, Hepatocellular- und Pankreaskarzinomen führt. [47, 48] Funato et al. (2018) zeigte das SIRT2 transkriptionelle Aktivität von p73 reguliert, indem die Lysine Lys₆₂₀, Lys₆₂₃ und Lys₆₂₇ des C-Terminus deacetyliert. Durch SIRT2 induzierte Inaktivierung von p73- mittels Knockdown oder Inhibierung durch AGK2- mindert die Proliferation und Tumorigenität von Glioblastomazellen [49] Neben Krebs ist SIRT2 auch in neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson und Alzheimer involviert. SIRT2 wird, wie alle anderen

SIRTUINE, ebenfalls im Gehirn exprimiert. [50, 51] SIRT2 steht im Zusammenhang mit der Aggregation von Proteinen wie α -Synuclein und Huntingtin, welche bei Parkinson und Huntington involviert sind. [52–54].

Nach Alzheimer ist Parkinson die zweithäufigste, neurogenerative Erkrankung, wobei das Alter der größte Risikofaktor ist. Spezifisch für diese Krankheit sind die Ansammlungen von aggregierten Proteinen, die hauptsächlich aus α -Synuclein bestehen. [55] SIRT2 reguliert die Anzahl, Größe und Zytotoxizität von α -Synuclein und eine Inhibition von SIRT2 führt zu größeren Aggregaten. [52]

Da SIRT2 als Suppressor bei manchen Krebsarten [56]- aber auch als Promotor im Tumorwachstum dient [57], rückte die Forschung für SIRT2 spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren in den Vordergrund, wobei in dieser Arbeit der Fokus auf der Inhibition der Sirtuine liegt. In den darauffolgenden Jahren wurden viele verschiedene Inhibitoren gegen Sirtuine entwickelt. Dazu zählen Ex-527 [58], Suramin [59] und indolbasierte Inhibitoren [60], die jedoch nicht selektiv oder potent genug für ein „drug target“ wären. Einer der ersten potenten SIRT2 Inhibitoren war das makrocyclische Peptid S2ILE5 mit einem IC_{50} -Wert von 13 nM, welches gegen SIRT3 jedoch mit ähnlicher Effektivität inhibiert. [39] Andere Inhibitoren wie Ex-527, Sirtinol und Saleramide induzieren zwar den Zelltod in p53 abhängigen Brustkrebs-Zelllinien *in vitro*, inhibieren aber neben SIRT2 auch SIRT1. [61]

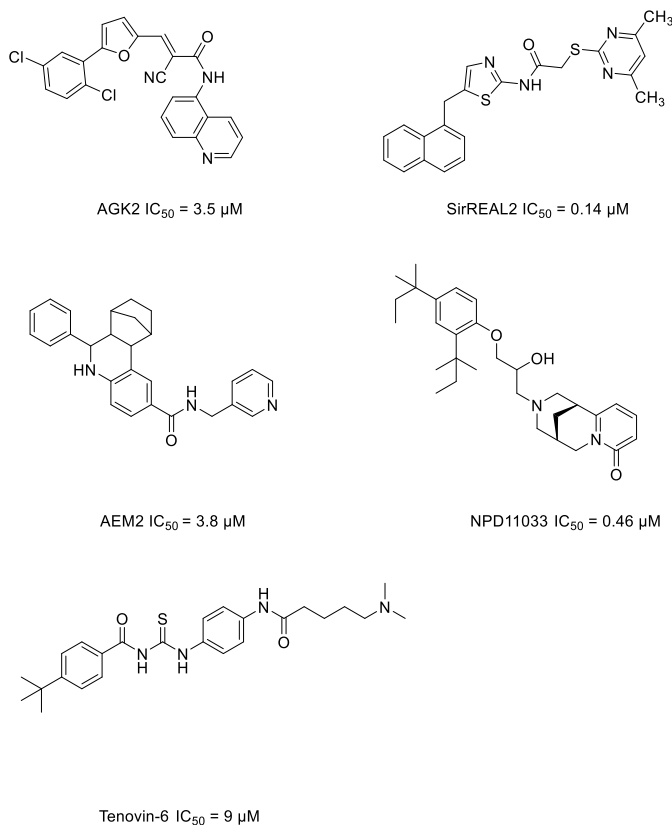


Abbildung 6: SIRT2 Inhibitoren – Auswahl verschiedener SIRT2-Inhibitoren und ihren IC_{50} -Wert gegen acetyliertes Peptid- oder Histonsubstrates

SIRT2 spezifische Inhibitoren sind AEM2 mit einem IC_{50} -Wert von $3.8 \mu M$ und AGK2 mit IC_{50} -Wert von $3.5 \mu M$. [62] AGK2 schützte in neurogenerativen Modellen vor einer α -Synuclein Vergiftung (Ansammlung), die für Parkinson üblich ist. [52] Der erste niedermolekulare Inhibitor mit „drug target“ Eigenschaften war SIRREAL2 ($IC_{50} = 140 \text{ nM}$) welcher durch sein *Rearrangement* des SIRT2 zu einem Isotopen spezifischen Inhibitions-Mechanismus führt, wobei SirREAL2 in einer hydrophoben Tasche (*selectivity pocket*), bindet, die durch die Umstrukturierung der Zn^{2+} -bindenden Domäne entsteht [63] NPD11033 ist ebenfalls ein potenter, selektiver und zellulär effektiver Inhibitor gegen Deacetylierung vom SIRT2. Die *selectivity pocket* bildet sich aus den hydrophoben Pheynalaninen (96, 119, 131, 190, 235) und Isoleucinen (93, 169, 232). Das Carbonyl-Sauerstoff von Gln₂₆₇ formt zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem NH_2 von Arg₂₉₇ und dem Stickstoff der Amidgruppe von Gln₁₆₇. Arg₉₇ erweitert die NAD^+ Bindetasche der Rossmann-Domäne des SIRT2 und fixiert den Komplex mit

NPD11033. Jedoch zeigen sowohl SirREAL2 als auch NPD11033 keine Inhibierung gegen Demyrystoylierung. [64]

Einen anderen Ansatz haben Inhibitoren mittels Thio-basierten *Warheads*. (Abb.7) Derivat AF8 besitzt eine langkettige(C7) Lysinmodifikation, welche über eine Thiourea-Verbindung verknüpft ist. Durch diesen *Warhead* formt sich ein AF8-ADP-Ribose-Intermediat, was zu einer Inhibierung gegen SIRT2 führt ($IC_{50} = 0.06 \mu\text{M}$). Diese Wirkungsbasierte Inhibition ist zwar selektive gegenüber SIRT1 ($IC_{50} = 11 \mu\text{M}$) und SIRT3 ($IC_{50} = 51 \mu\text{M}$) jedoch ebenfalls nur gegen acetyliertes Substrat. [65]

Der peptidbasierte Inhibitor TM ist stattdessen über einen Thioamid-*Warhead* verbunden. Dieser zeigt einen IC_{50} -Wert von 40 nM gegen acetyliertes Substrat-Peptid und einen IC_{50} Wert von 50 nM gegen myristoyliertes Substrat-Peptid. Jedoch erfolgt die Myristoylinhibition erst nach einer Inkubation von 1 h, während ohne Inkubation keine Inhibition detektiert wurde. Durch die Vorinkubation formt sich ebenfalls ein TM-ADP-Ribose Intermediat, wodurch weder Acetyl noch Myristoyl von SIRT2 umgesetzt werden kann. Aufgrund der Konkurrenz zu H3K9Myr, bindet TM schwächer, da H3K9Myr durch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung im Peptidrückgrat stabilisiert wird (höhere Affinität). [66]

Weitere peptidbasierte Inhibitoren sind S2DMi-7 (Amid-*Warhead*) und S2DMi-9 (Thioamid-*Warhead*) Beide Derivate inhibieren SIRT2 gegen Acetyliertes ($IC_{50} = 19 \text{ nM}$ und 22 nM) und myristoyliertes ($IC_{50} = 51 \text{ nM}$ und 44 nM) Substrat-Peptid, jedoch durch unterschiedliche Wirkungsweisen. Während S2DMi-7 das aktive Zentrum blockiert und somit die Bindung des Substrat-Peptids verhindert, bildet S2DMi-9 einen kovalenten Komplex mit NAD^+ , welches durch HPLC detektiert werden konnte. Jedoch inhibierten beide Derivate ebenfalls gegen SIRT1 und SIRT3 im nanomolaren Bereich und sind somit unselektiv [67] Ein weiteres Problem bei Thiourea- und Thioamidbindungen ist zudem, dass sie instabil und toxisch *in vivo* sind, außerdem können HDAC Thioamid-Bindungen spalten. [68]

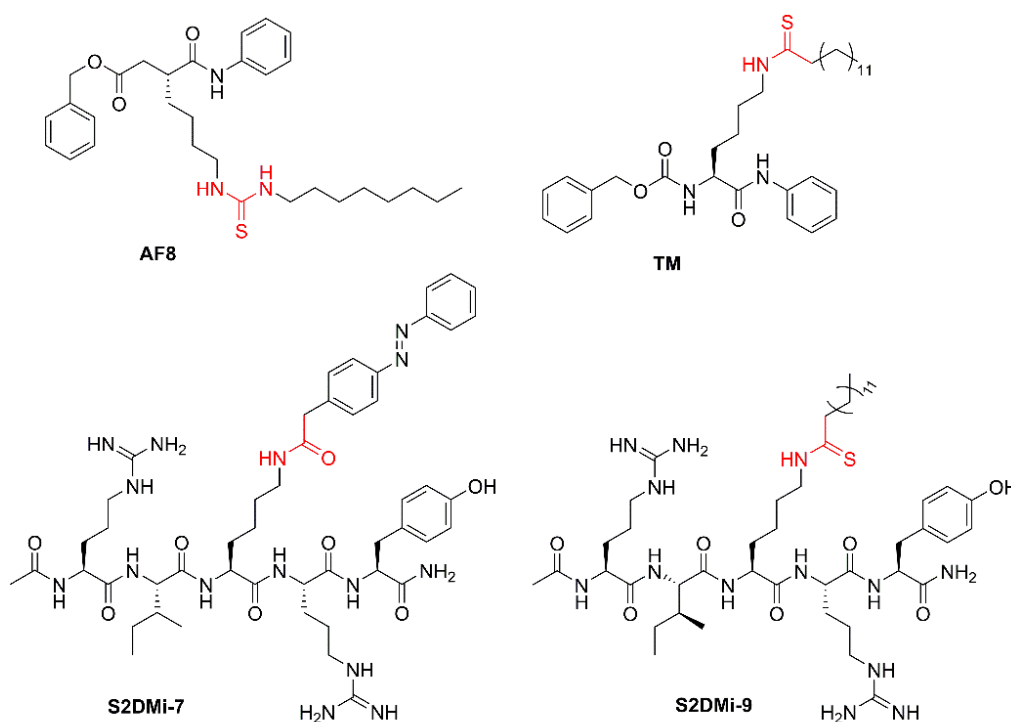


Abbildung 7: *Warheads* für SIRT2, AF8 mit einem Thiourea- [65], TM [66], S2DMi-7 und -9 [67] mit einem Amid oder Thioamid- *Warhead*

1.4 SIRTUIN 5

Im Gegensatz zu SIRT2 ist SIRT5 als schwache Deacetylase beschrieben, agiert jedoch als effektive Deacetylase gegen langkettige Modifikationen wie Succinyl-, Glutaryl- oder Malonylmodifikationen. Das liegt an der Affinität für negativ geladene Acylreste, die in das aktive Zentrum von SIRT5 soweit reinreichen, das sie mit den Aminosäuren Tyr₁₀₂ oder Arg₁₀₅ interagieren.[29] Genau wie SIRT2 besteht SIRT5 aus der großen Rossmann-Domäne mit der NAD⁺-Bindestelle. Diese Region besteht aus den bereits erwähnten, sechs parallelen β -Faltblättern, welche von sieben α -Helices umgeben sind. Die Zn²⁺-bindende Domäne besteht aus drei antiparallelen β -Faltblättern und fünf α -Helices. Die β -Faltblätter sind tetraedrisch durch die vier Cysteine (Cys₁₆₆, Cys₁₆₉, Cys₂₀₇ und Cys₂₁₂) stabilisiert und werden durch Zn²⁺ stabilisiert. Mehrere Schleifen umgeben die Bindestellen von Substrat und NAD⁺. [59, 69, 70] In **Abbildung 8** ist SIRT5 dargestellt, welches H3K9-Thioacetyl durch Interaktion mit den Aminosäuren His₁₂₉ und Phe₁₉₄ gebunden hat. Der Acetyl-rest ragt nicht tief genug in die Bindetasche, um mit Tyr₁₀₂ oder Arg₁₀₅ Wasserstoff- und Ionenbindungen eingehen zu können. Die Aminosäuren Phe₂₂₃, Leu₂₂₇ und Val₂₅₄ bilden eine hydrophobe Barriere, die den Zugang zum aktiven Zentrum durch große Lysin Modifikationen verhindert. [29]



Abbildung 8: Röntgenkristallstruktur von SIRT5 aus Roessler et al. (2014) (pdb 3RIG) in Grün. In der Substrat-Bindestelle ist H3K9-Thioacetyl (Dunkelblau) gebunden. Erstellt über Uniprot 3D-Struktur viewer

Aufgrund der Deacetylase- und Deacylase-Aktivität ist SIRT5 ebenfalls an verschiedenen metabolischen Prozessen beteiligt. Unter anderem aktiviert SIRT5 mehrere Enzyme in der Glykolyse, im Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) und dem Elektronen-Transport. Im TCA-Zyklus fördert SIRT5 die Umwandlung von Isocitrat in α -Ketoglutarat durch die Desuccinylierung von Isocitrat-Dehydrogenase 2 (IDH2). Inhibiert man SIRT5 erhöht dies die Succinylierung von IDH2 und dessen Aktivität wird eingeschränkt. [71] Im TCA-Zyklus führt die Desuccinylierung von Succinat Dehydrogenase-Untereinheit A (SDHA) dagegen zur Inhibition, welche die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert. [2] Die Desuccinylierung durch SIRT5 spielt auch eine Rolle in der β -Oxidation von Fettsäuren statt. Zusammen mit einer Deacetylierung durch SIRT3 stabilisiert es die

Assoziation des essenziellen Flavin-Adenin-Dinukleotid Cofaktor im aktiven Zentrum der VLCAD (*Very long chain acylCoA dehydrogenase*) Dadurch wird die Aktivität von VLCAD erhöht und steigert die Umwandlung von Acyl-CoA in Enoyl-CoA. [72] Die Desuccinylierung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Synthase 2 (HMGCS) durch SIRT5 reguliert die Umwandlung von Acetyl-CoA in einen Ketonkörper.

Ketonkörper versorgen Herz, Gehirn und Skelettmuskulatur während einer Fastenphase mit Energie. Bei einer SIRT5 Inhibierung kommt es, wie bei IDH2, zu einer Succinylanreicherung und einer verringerten Aktivität von HMGCS2.[73] Im Harnstoffzyklus spielt SIRT5 eine Schlüsselrolle, indem Carbamoylphosphat-Synthase 1 (CPS1) deacetyliert, desuccinyliert und deglutaryliert wird. Dadurch fördert SIRT5 die CPS1 Aktivität in der Leber und hilft der Entgiftung im Körper. [74–76]

Durch sein Einwirken in den verschiedenen metabolischen Prozessen spielt SIRT5 eine Rolle zur Behandlung von verschiedenen Krebsarten, wie Magenkrebs [77], Brustkrebs [78] oder Dickdarmkrebs [79, 80] Bei diesen Krebsarten wäre eine Aktivierung von SIRT5 der therapeutische Ansatz. Nicht so beim hepatozellulären Karzinom (HCC), welches die häufigste Leberkrebsart ist [81] SIRT5 ist in HCC-Zellen stark überexprimiert und fördert somit die Lymphknotenmetastasierung. SIRT5 reguliert die Zellproliferation und Invasion von HCC-Zellen, indem es den E2F Transkriptionsfaktor 1 (E2F1) aktiviert. [82] Dadurch wird die Apoptose der HCC-Zellen inhibiert. [83] Eine Inhibierung von SIRT5 bietet einen Therapie Ansatz gegen HCC.

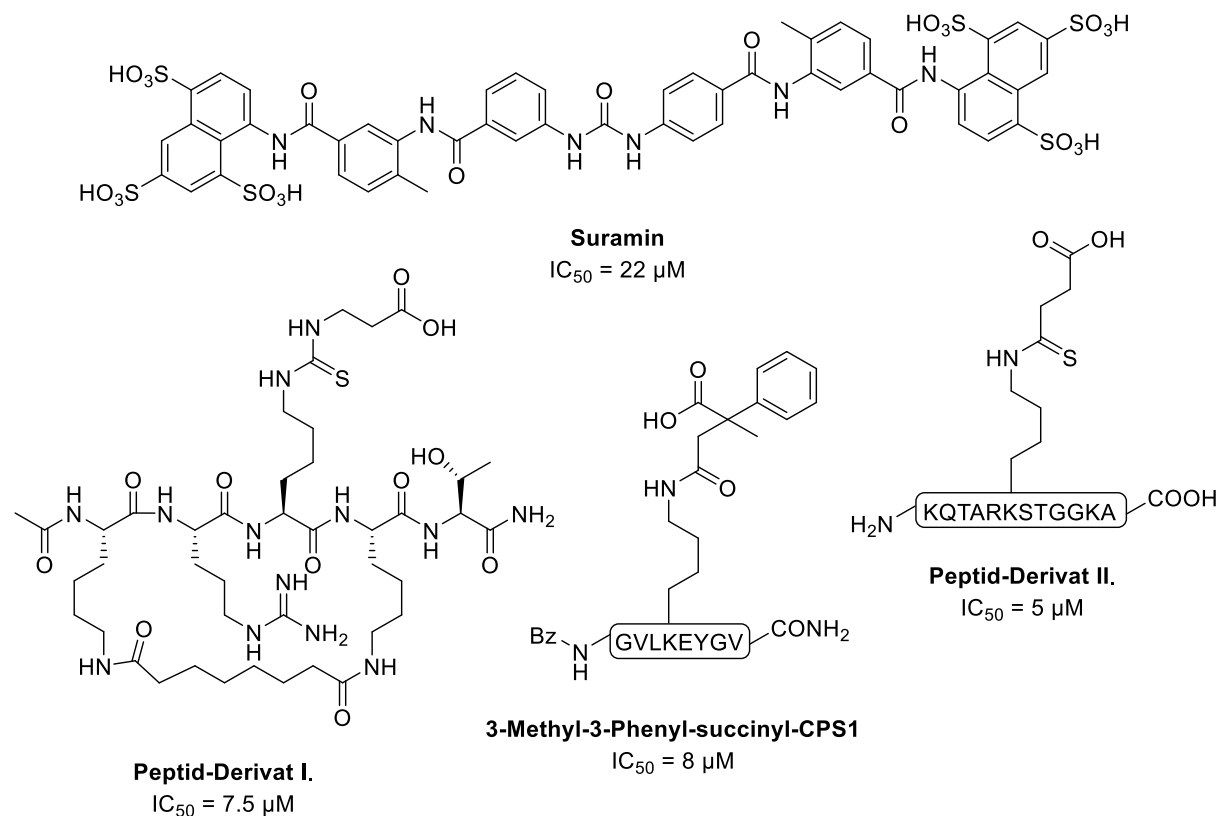


Abbildung 9: Strukturen der verschiedene SIRT5 Inhibitortypen - Suramin [59], 3-Methyl-3-Phenyl succinyl cps1 [84], Thioamid-Warhead I [85] und Thiourea-Warhead II [86]

Es gibt verschiedene Ansätze für SIRT5 Inhibitoren, wie z.B. die „drug target“ Ähnlichen, wozu auch Suramin zählt. Suramin bindet in der B- und C-Bindetasche von NAD⁺ und an der Substratbindestelle von SIRT5, wobei die Sulfonate mit den Aminosäuren Tyr₁₀₂, Arg₁₀₅, Arg₇₁ und Arg₁₄₁ interagieren. Suramin inhibiert SIRT5 mit einem IC₅₀-Wert von 22 µM, fungiert aber auch als Inhibitor für SIRT1/2/3 (IC₅₀-Wert = 5-75 µM) [59]. und ist somit unselektiv. Weitere Ansätze sind peptidbasierte Inhibitoren, z.B. mit Thiourea- oder Thioamid-Warheads. Thioamidinhibitoren wie Peptid-Derivat I [87] haben einen IC₅₀-Wert von 5 µM, doch aufgrund ihrer Instabilität und Zelltoxizität konzentrierte man sich eher auf die Thiourea basierten Inhibitoren. [88] Diese zeigten eine starke Inhibition gegenüber SIRT5, die auch noch selektiv, oxidationsresistent und metabolisch stabil ist. Peptid-Derivat II [86] mit dem Warhead *Nε-Carboxyethyl-Thio-Carbamoyl-Lysin*, welches mit Tyr₁₀₂ und Arg₁₀₅ interagiert, erwies sich als selektiver Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 7 µM und durch das cyclische Pentapeptid proteolytisch stabil [86].

Im gleichen Bereich inhibieren Peptid-Derivate mit Thioxo-warheads. Der Inhibitionsmechanismus beruht auf einem niedrigen k_{cat}-Wert, weil sich während der Desuccinylierungsreaktion ein kovalentes 1'-S-Alkylimidat-Intermediat bildet. Der IC₅₀-Wert gegen SIRT5 liegt bei 5 µM und ist selektiv gegenüber SIRT1, SIRT2 und SIRT3 [85] Basierend auf diesen Ergebnissen zeigte Roessler *et al.* 2014 das Thiosuccinyl-CPS1-Peptide ebenfalls diesem Mechanismus unterliegen und im mikromolaren Bereich inhibieren. Das Peptid-Derivat 3-Phenyl-Succinyl-CPS1 inhibiert SIRT5 mit einem K_i-Wert von 100 µM. Strukturanalysen haben gezeigt, dass der Inhibitor die gleichen Bindungen wie das Substrat Succinyl-CPS1-Peptid eingeht und die Phenyl-Substitution sich in Richtung der NAD⁺-Bindetasche dreht. Durch die Einführung einer weiteren Methylgruppe am C3-Atom erhöhte sich der K_i des 3-Methyl-3-Phenyl-Succinyl-CPS1 um das 20-fache auf 4.3 µM, während sich gegen die SIRTUINE 1,2 und 3 keine Inhibition bis 50 µM zeigte. [84]

1.5 Zielstellung

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen von SIRT2- und SIRT5-Inhibitoren, war es das Ziel dieser Arbeit die thiooxobasierenden Inhibitoren weiterzuentwickeln und anhand eines umfassenden *Screenings* potente und selektive Inhibitoren im nanomolaren Bereich zu generieren. Dafür ist es wichtig, eine einfachen Syntheseweg zu entwickeln, um möglichst viele Peptid-Derivate in kurzer Zeit zu synthetisieren und zu charakterisieren, angefangen mit SIRT5 und analog fortgeführt mit SIRT2. Da für SIRT2 bis heute aber nur bekannte Deacetylase Inhibitoren publiziert worden sind, definierten wir unseren Fokus im finalen Abschnitt auf die Inhibition gegen SIRT2 Demyristoylierung ohne Vorinkubation. Die Messung und Charakterisierung all jener Inhibitortypen stand ebenfalls im Fokus, um ein besseres Verständnis für den Wirkungsmechanismus der SIRTUINE zu erlangen. Bei potenten Ergebnissen sollten die Peptide verkürzt werden um dem „drug target“ näher zu kommen. Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse dieses *Screenings* und die ausführlichen Charakterisierungen der Peptid-Derivate mittels verschiedener Methoden wie HPLC, Fluoreszenz-Spektrometrie, Oberflächenresonanz-Spektroskopie und *Microscale thermophoresis* vermessen und evaluiert.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Für die Festphasenpeptidsynthese wurden handelsübliche Fmoc-L-Aminosäure-Derivate und selbst synthetisiertes Fmoc-L-Lys(NS)-OH verwendet. Als polymerer Träger diente das Rink-Amid MBHA-Harz der Firma Merck KGaA..

Alle verwendeten Chemikalien wurden mindestens mit dem Reinheitsgrad zur Analyse bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH erworben, falls nicht anders im Text beschrieben

2.1.1 Peptid-Derivate

In der untenstehenden Tabelle sind alle Peptide-Derivate aufgelistet, die für diese Arbeit synthetisiert und mit dem entsprechenden Enzym vermessen wurden

Tabelle 1: Verwendete Peptide-Derivate

| Struktur des Peptid-Derivates | Molekulargewicht [g/mol] | Enzym |
|--|--|---------------|
| Bz-GVLK(Acetyl)EYGV-NH ₂ | 1009 | 5 |
| Bz-GVLK(Succinyl)EYGV-NH ₂ | 1067 | 5 |
| Bz-GVLK(X)EYGV-NH ₂ | Abhängig von der jeweiligen Lysin Modifikation | 5 (1;2;3;4;6) |
| Ac-LK(X)A-NH ₂ | Abhängig von der jeweiligen Lysin Modifikation | |
| Abz-GVLK(Glut)AY(NO ₂)GV-NH ₂ | 1083 | 5 |
| Abz-GVLKAY(NO ₂)GV-NH ₂ | 958 | Trypsin |
| Ac-EALPKK(Acetyl)TGG-NH ₂ | 982.5 | 1;2;3 |
| Ac-EALPKK(Myristoyl)TGG-NH ₂ | 1150 | 2;3;6 |
| Ac-EALPKK(Acetyl)Y(NO ₂)GG-NH ₂ | 1089.5 | 1;2;3 |
| Ac-EALPKK(Myristoyl)Y(NO ₂)GG-NH ₂ | 1258.5 | 2;3;6 |
| Ac-EALPKK(X)Y(NO ₂)GG-NH ₂ Ac-KK(X)T-NH ₂ Ac-KK(X)-NH ₂ Ac-K(X)T-NH ₂ Ac-K(X)-NH ₂ CF-KK(X)-NH ₂ Biotin-ttds-KK(X)-NH ₂ | Abhängig von der jeweiligen Lysin Modifikation | 2;3 (1;4;5;6) |

2.1.2 Puffer

Tabelle 2 Überblick der verwendeten Puffer

| Puffer | Inhaltsstoffe | Verwendungszweck |
|--------------|---|--|
| SIRT-Puffer | 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ bei pH 7.8 | Für alle kinetischen Messungen mit SIRTUINEN |
| MST-Puffer | (137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4) | <i>Microscale-Thermophorese</i> Messungen |
| PBS Puffer | (4 mM KH ₂ PO ₄ , 16 mM Na ₂ HPO ₄ , 115 mM NaCl, pH 7.4) | SPR-Messungen |
| Lysis Puffer | (100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0) | Klonierung, Expression und Reinigung |

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Eingesetzte Geräte und Firmenzugehörigkeit

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Analytische HPLC 1 | <ul style="list-style-type: none"> - Agilent 1100 Series, Quarternary Pump, Autosampler und VWD-Detektor (Kalifornien, USA) - Säule: Phenomenex, Kinetex 2,6 µm XB-C18 (50 x 3,0 mm; 100 Å) - Software: Agilent HP Chemstation |
| Analytische HPLC 2 | <ul style="list-style-type: none"> - MERCK Hitachi, LaChrom Interface D-7000, Pump L-7100, Autosampler L-7200, Diode Array Detector L-7450 (Darmstadt, DEU) - Säule: Phenomenex 5 µm XB-C18 (250 x 4,6 mm; 100 Å) - Software: HPLC System Manager D-7000 |
| Präparative HPLC 1 | <ul style="list-style-type: none"> - MERCK Hitachi LaChrom, Pump L-7150, Intelligent Pump L-6200, variable Wavelength UV monitor 653A-23 (Darmstadt, DEU) - Schreiber: Pharmacia LKB-REC 102 Chart Recorder |
| Präparative HPLC 2 | <ul style="list-style-type: none"> - Shimadzu, Pump LC-20AP, Collector FRC-10A, Detektor SPD-20A Düsseldorf, DEU) - Säule: MERCK Hibar® pre-packed column (250 x 25 mm) LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) - Phenomenex, Kinetix 5 µm XB-C18 (250 x 21,1 mm; 100 Å) - Software: Realtime Analysis Labsolutions |
| Fluoreszenz Mikrotiter Plattenmessgerät | <ul style="list-style-type: none"> - TECAN Ultra Evolution - Software: Magellan 5 |
| Lyophilisator | <ul style="list-style-type: none"> - Christ Alpha 2-4 mit Vakuumpumpe; Vacuubrand RCG |
| UPLC-MS/MS | <ul style="list-style-type: none"> - Waters Acquity UPLC-MS - Säule: Waters Acquity-UPLC-MS-BEH C18; 1,7 µm (2,1 x 50 mm; 30 Å) - Software Masslynx Software |
| Microscalethermophoresis | <ul style="list-style-type: none"> - Nanotemper Monolith N1.15 (München, Deutschland) |
| Oberflächenplasmonenresonanz Spektrometer | <ul style="list-style-type: none"> - BIAcore, (Uppsala, Schweden) |

2.2 Methoden – Peptidsynthese

2.2.1 Generelle Methoden

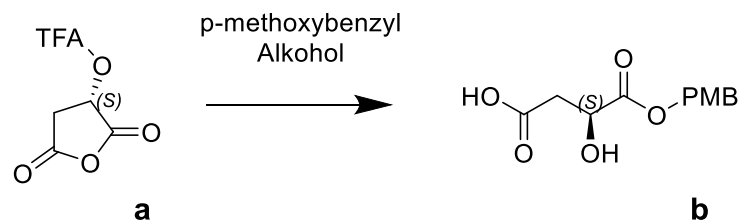
Für die mobilen Phasen der HPLC-Messungen wurden H₂O (Lösung A) und Acetonitril (Lösung B) eingesetzt, welche beide mit 0.1 % Trifluoressigsäure versetzt waren. Für die Probenanalyse wurde eine Agilent 1100 HPLC-Anlage, ausgestattet mit einer quaternären Pumpe, einen *well*-Platten-Autosamplern und variablen Wellenlängendetektoren, verwendet. Die Trennungen erfolgten mit einer Phenomenex Kinetix™ XB-C18 Säule (2.6 µm; 3 x 50 mm) und einem linearen Gradienten von 25-55 % Lösung B in 4 min oder 5-95 % Lösung B in 6 min und einer Flussrate von 0.6 ml min⁻¹. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen (λ) 220 nm, 260 nm und 340 nm bzw. 360 nm (Peptid-Derivate mit eingebauten Nitrotyrosin im Rückgrat). Für die Reinigung der Peptid-Derivate wurde ein Shimadzu LC System mit einer Phenomenex Kinetex™ XB C18 Säule (5 µm, 250 x 21.1 mm; 100 Å) genutzt. Die präparative Trennung erfolgte mit einem linearen Gradienten von 25 zu 90 % Lösung B in 80 min und einer Flussrate von 15 ml min⁻¹. Die eluierten Komponenten wurden bei 220 und 260 nm detektiert und mittels UPLC-MS (Waters Acquity UPLC-MS System von Milford USA) und der Säule Waters Acquity-UPLC-MS-BEH C18; (1,7 µm; 2,1 x 5 mm, 30 Å) analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mittels Waters MassLynx Software. Die NMR-Spektroskopie wurde mit einem Varian-Gemini 2000 Spektrometer in deuteriertem Chloroform oder deuteriertem Dimethylsulfoxid gemessen.

2.2.2 Festphasenpeptidsynthese

Die Peptid-Derivate Bz-GVLK(Ns)EYGV-NH₂ und Ac-LK(Ns)A-NH₂ wurden mittels MBHA-Rink Amid Harz und einer Beladungsdichte von 0,58 mmol/g (IRIS Biotech), nach der üblichen Fmoc-Basen-Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Zuerst wurden 0.5 mmol des Harzes für 20 min mit Dimethylformamid (DMF) behandelt. vier Äquivalente (Äq) der Fmoc-geschützten Aminosäure (Anaspec) wurden mit vier Äq HBTU und acht Äq DIPEA in DMF aktiviert und für mindestens eine Stunde gekoppelt. Danach erfolgte die Entschützung der Fmoc-Gruppe indem zwei Mal für 10 min mit 20 % Piperidin in DMF gewaschen wurde, gefolgt von fünf x 5 min waschen mit DMF. Die letzte Aminogruppe wurde entweder mit vier Äq Benzoesäure und acht Äq *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) in DMF oder vier Äq Essigsäureanhydrid und acht Äq DIPEA in DMF für 30 min gekoppelt. Die Peptid-Derivate Ac-EALPKK(Ns)Y(NO₂)GG-NH₂, Ac-KK(Ns)T-NH₂, Ac-KK(Ns)-NH₂, Ac-K(Ns)T-NH₂, CF-KK(Ns)-NH₂ und das Lysinderivat Ac-K(Ns)-NH₂ wurden mittels Fmoc-basierter Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung des automatischen Mikrowellen-Peptidsynthesizers Liberty Blue (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) synthetisiert. Die Kopplung der Aminosäuren wurde mit DIC/OxymaPure bei 90 °C für 2 min durchgeführt. Alle Kopplungsschritte wurden zweimal durchgeführt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 10 %iger Piperazinlösung in Ethanol hergestellt (N-Methyl-2-Pyrrolidon (1:9, v/v) mit 0,1 M N-Hydroxybenzotriazol bei 90 °C für 1 Minute). Für die Peptid-Derivate S2i-CF-1, S2i-CF-12, S2i-CF-13 und SD-CF-3 wurden drei Äq von 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) und acht Äq DIPEA in DMF über Nacht inkubiert und anschließend mit 20 % Piperidin in DMF gewaschen. Für die N-terminale Biotinylierung wurden drei Äq HBTU, drei Äq Biotin und drei Äq DIPEA in DMF:DMSO (1:1 v/v) gelöst und für 3 h mit dem Harz inkubiert (S5i-BT-33, S5i-BT-33(S), S2i-BT-1, S2i-BT-11 und S2i-BT-12)

Das zu modifizierende Lysin wurde unter Verwendung einer ϵ -Nosyl-Gruppe (Ns, 2-nitrobenzenesulfonyl) geschützt. Dies erlaubte eine selektive Modifizierung der Lysin-Seitenkette am Harz. Das Aminosäure-Derivat Fmoc-Lys(Ns)-OH wurde nach Schuster et al. (2016) [89] synthetisiert. Die Nosyl-Schutzgruppe wurde zwei Mal \times für 90 min mit fünf Äq Thiophenol und fünf Äq 1,8-Diazabicycloundec-7-en (DBU) in DMF gewaschen und damit entfernt. Die freie Lysin-Seitenkette wurde für 4 h mit vier Äq Maleinsäureanhydrid und acht Äq DIPEA in DMF behandelt und anschließend mit DMF gewaschen. Danach erfolgte eine Michaelis-addition mit 4 äq des jeweiligen Mercaptan Derivates und 8 äq DIPEA in DMF über Nacht. Nach mehrmaligen Waschen (5 x 4 min) mit DMF, DCM (Dichlormethan), Methanol und erneut mit DCM trennte man das Peptid-Derivat vom Harz mit einer TFA-Wasserlösung (95:5 v/v) (2 x 60 min). Die TFA wurde abgedampft und das Peptid in Essigsäure (< 2 ml) gelöst. Nach Reinigung mittels *reversed phase* HPLC, wurden die gesammelten Fraktionen mittel UPLC-MS analysiert und die Fraktionen mit dem Zielpeptid lyophilisiert.

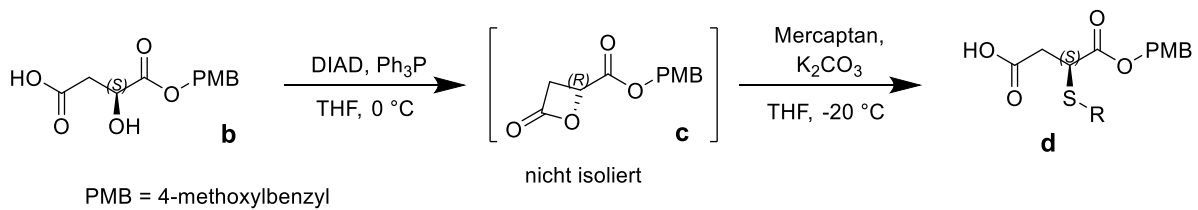
2.2.3 (S)-2-Hydroxysuccinylsäure 1-(4-Methoxybenzyl)ester (b)



PMB = 4-methoxybenzyl

Formel 1: 3,2 g (15 mmol, ein Äq) von (S)-2-Trifluoracetoxysuccinylanhydrid (a) (welches nach der beschriebenen Methode [90] aus (S)-Maleinsäure gewonnen wurde) wurde mit 9,3 ml (75 mmol, fünf Äq) von 4-Methoxybenzyl alkohol gemischt und bei Raumtemperatur (RT) über Nacht durchmischt. Das gewonnene Öl wurde mit 50 ml Ethylacetat (EtOAc) verdünnt und mehrere mal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde kombiniert, mit EtOAc gewaschen und mit verdünntem Chlorwasserstoff (HCl) angesäuert. Das Gemisch wurde anschließend mit DCM extrahiert und die organische Phase mit H_2O gewaschen. Nach der Trocknung mit Na_2SO_4 entstanden 3.16 g des unsauberen Esters. Nach einer Rekristallisation mit 14 ml eines EtOAc-Petroleum-Ether Gemischs (1:1) erhielt man 2.2 g reinen 2-Hydroxysuccinylsäure 1-(4-methoxybenzyl)ester (b)

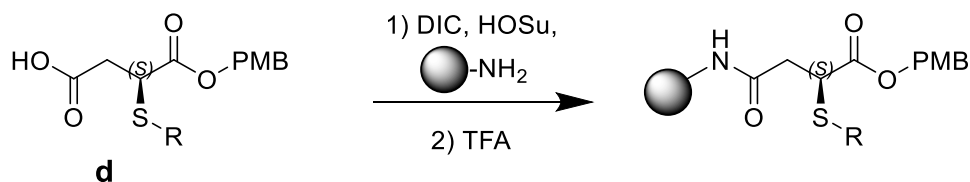
^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.29 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.34 (dd, $J = 7.5, 5.1$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.61 (dd, $J = 15.8, 5.1$ Hz, 1H), 2.52 - 2.40 (m, 1H).

2.2.4 (*S*)-2-(2-Mercapto)succinylsäure 1-(4-Methoxybenzyl)ester (d)

Formel 2: In einem mit Eiswasser gekühlten Kolben wurden 508.5 mg (2 mmol) 1-(4-methoxybenzyl)ester (**b**) und 525 mg (2 mmol) Triphenylphosphan (Ph₃P) in 9 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Zu dieser Lösung wurden innerhalb von 5 min tropfenweise 393 µl (404 mg, 2 mmol) Diisopropylazodicarboxylat, gelöst in 2 ml THF, hinzugefügt und über Nacht, bei Raumtemperatur, gerührt. Am nächsten Tag wurde die gelbliche Lösung mit einer Eis-Salz-Mischung auf -15 °C runtergekühlt und 320 mg (2 mmol) kristallines Mercaptan hinzugefügt. Danach fügte man 276 mg (2 mmol) festes Kaliumcarbonat (K₂CO₃) hinzu und kühlte die Mischung für weitere 20 min. Anschließend rührte man das Gemisch für 60 min bei Raumtemperatur und isolierte das Produkt mit einer Säuren-Basen Extraktion, welche schon im Abschnitt 2.2.3 beschrieben wurde. Man erhielt 0.52 g unsauberes Produkt mit 25 % Ausgangsmaterial. Nach einer Rekrystallisation konnte das Zwischenprodukt für weitere Reinigungen genutzt werden.

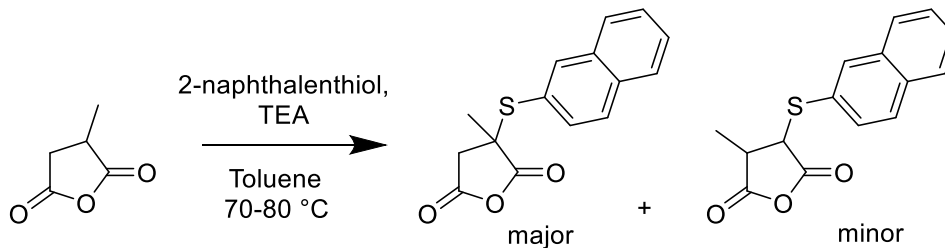
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.98 - 7.78 (m, 4H), 7.59 - 7.43 (m, 3H), 7.06 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.75 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.96 (dd, J = 28.2, 12.1 Hz, 2H), 4.15 (dd, J = 8.6, 6.6 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.77 (dd, J = 7.6, 2.0 Hz, 2H).

2.2.5 Generelle Herstellung der Maleinsäure Derivate S5i-1 bis S5i-38



Formel 3: Die Lösung enthielt 20 mg (0.5 mmol) (*S*)-2-(2-Naphthylmercapto)succinylsäure 1-(4-Methoxybenzyl)ester (**d**) und 7 mg (0,06 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu) in 500 µL trockenem THF und 9 µL (0.06 mmol) *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide. Nach 30 min wurden zwei Äq (0.1 mmol) des gewünschten Peptidrückgrats hinzugefügt. Der Prozess wurde mit Dünnschichtchromatografie oder HPLC verfolgt. Für eine gute Ausbeute bei aromatischen Aminen wurden zwei Äq Triethylamin hinzugefügt. Nach Abschluss der Reaktion wurde THF verdampft und das Peptid-Derivat in 500 µl TFA:H₂O (95:5 v/v) für 30 min gelöst. Die Lösung wurde *in vacuo* aufkonzentriert und mittels RP-HPLC gereinigt. Die Fraktionen mit dem Zielpeptid-Derivat wurden lyophilisiert.

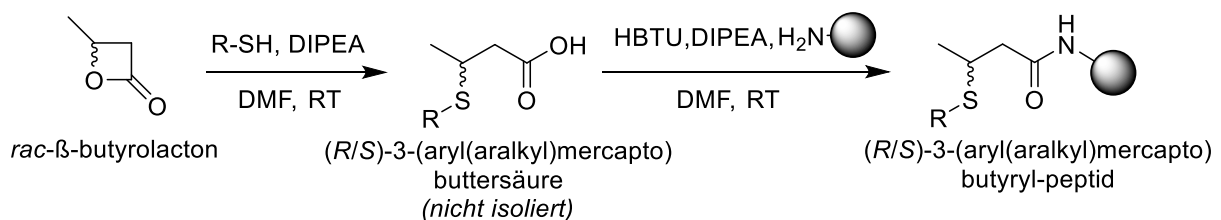
2.2.6 Synthese von 2-Methyl 2-(2-Naphthylmercapto)succinylanhydrid (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)



Formel 4: Diese Komponente wurde wie das in Zienty et al. (1962) beschriebene 2-Methyl-2-(4-chlorophenylthio)succinylanhydrid [91] synthetisiert. 1.12 g (10 mmol) Citraconsäureanhydrid und 1.6 g (10 mmol) 2-Naphthalenethiol wurden mit 1 ml Toluene gelöst und 4 μl Triethylamin hinzugefügt. Die Lösung wurde für 1 h bei 70-80 $^\circ\text{C}$ gerührt. Die flüchtigen Stoffe wurden mittels Vakuum entfernt und der Rest über eine *Flash*-Chromatographie gereinigt. Durch die Rekrystallisation mit einer Petroleum-Ether-EtOAc (3:1 v/v) Lösung erhielt man die reine Komponente

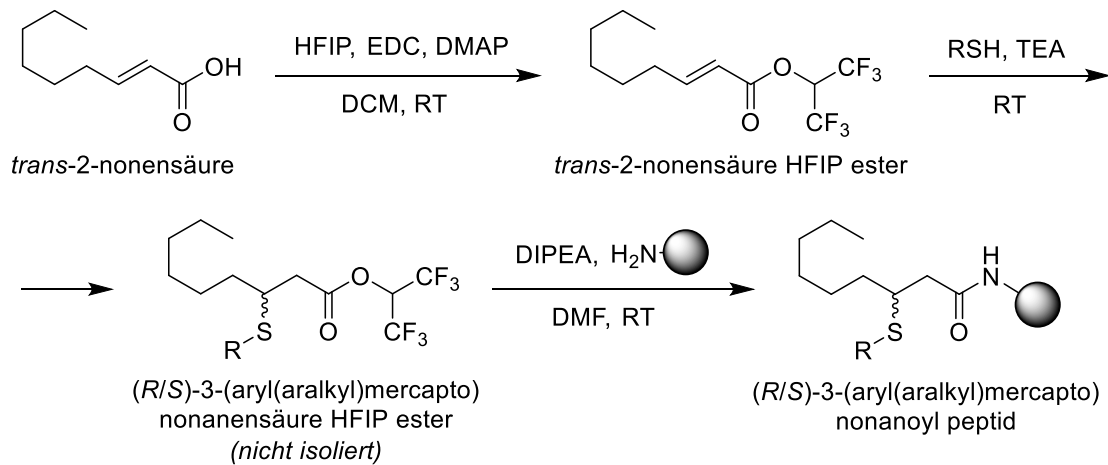
$^1\text{H NMR}$ (700 MHz, CDCl_3): 8.08 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.88 – 7.82 (m, 3H), 7.59 – 7.51 (m, 3H), 3.14 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 3.07 (d, $J = 18.8$ Hz, 1H), 1.70 (s, 3H).

2.2.7 Genereller Syntheseprozess der substituierten (*R/S*)-3-(aryl(oder benzyl)mercapto)-butyroyl derivative S2i-a-c, S2i-1-11, S2i-KK-1, S2i-KT-1, S2i-K-1, S2i-BT-1, S2i-BT-11 und S2i-CF-1 (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)



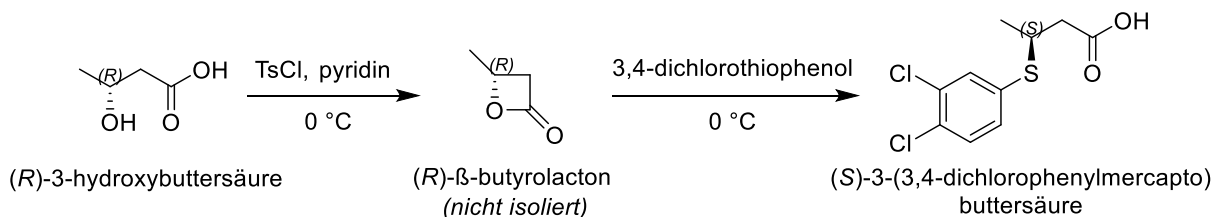
Formel 5: Die Synthese erfolgte anhand der Reaktion von 2.2 Äq racemisches Beta-Butyrolacton, 2.5 Äq von dem dazugehörigen Mercaptan und fünf Äq DIPEA in DMF über Nacht. Danach wurde das Produkt (*R/S*)-3-(Arylmercapto)-buttersäure *in situ* mit 2.5 Äq HBTU aktiviert und für 1 h mit dem Harz inkubiert.

2.2.8 Genereller Syntheseprozess der substituierten (*R/S*)-3-(arylmercapto)-nonanoyl (oder hexadecanoyl) derivative S2i-12-14, S2i-KK-14, S2i-BT-12, S2i-CF-12 und S2i-CF-12 (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)



Formel 6: 5 mmol *trans*-2-Nonensäure (oder 2-Hexadecansäure (TCI)), 6 mmol Hexafluoroisopropanol (HFIP) und 1 mmol 4-Dimethylaminopyridine wurden in 10 ml DCM gelöst und unter kontinuierlichem Rühren 6 mmol 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC*HCl) tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt und mit DCM verdünnt. Nach Extraktion mit verdünnter Zitronensäure, wurde die organische Phase separiert, zwei Mal mit dH₂O gewaschen und mittels MgSO₄ getrocknet. 0.33 mmol des daraus entstandenen unsauberen HFIP-esters wurden mit 0,4 mmol Mercaptan und 0,4 mmol TEA gemischt und über Nacht bei RT inkubiert (in einigen Fällen wurde DCM hinzugefügt, um eine vollständige Auflösung sicherzustellen). Am nächsten Tag wurden acht Äq DIPEA und acht Äq DMF hinzugefügt und mit dem Harz über Nacht inkubiert.

2.2.9 Synthese des (*S*)-3-(3,4-dichlorophenylmercapto)-butyryl derivat S2i-1(*S*) (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)



Formel 7: Zu 0.52 g (5 mmol) (*R*)-3-Hydroxybuttersäure in 20 ml Pyridin wurden 1.43 g (7.5 mmol) 4-Toluenesulfonylchlorid, gelöst in 5 ml Pyridin, tropfenweise hinzugefügt und bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde über Nacht im schmelzenden Eisbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0.95 ml (7.5 mmol) des benötigten 3,4-Dichlorothiophenol hinzugefügt und für 24 h bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde in 300 ml H₂O verdünnt und zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Die kombinierten Ethylacetat Fraktionen wurden mit H₂O gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die unsaubere (*S*)-3-(3,4-Dichlorophenylmercapto)-buttersäure wurden mit ein Äq HBTU, zwei Äq DIPEA und dem Harz gebundenen Peptid in DMF für 1 h gekoppelt.

2.2.10 Genereller Syntheseprozess für die (R/S)-3-(arylmercapto)-3-arylpropionyl) Peptid-Derivate S2i-c-h (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)

Wie in 2.2.8 beschrieben wurde die β -Aryl-acrylsäure (Zimtsäure für die Komponenten S2i-c,d und S2i-f,g Acetamido-zimtsäure für S2i-e und 2-Naphthalen-2-acrylsäure für S2i-h) in ihren HFIP-ester umgewandelt, mit dem korrespondierenden Mercaptan versetzt und die resultierenden HFIP-ester des 3-(Arylmercapto)-3-aryl-propionsäuren *in situ* für die Acylierung genutzt. Nach der gewünschten Modifikation des Lysinrestes wurde das Harz mehrmals mit DMF, DCM, Methanol und erneut mit DCM gewaschen (5-mal je 4 min). Durch Inkubation mit TFA/Wasser (95:5 v/v) für zweimal 1h wurde das Peptid vom Harz getrennt. Die TFA/Wasser Lösungen wurden vereint, eingeengt und in Essigsäure verdünnt. Nach der Reinigung mittels RP-HPLC wurden die gesammelten Fraktionen unter Verwendung einer HPLC-MS analysiert, die Fraktionen, welche das reine Zielpeptid enthielten vereint und lyophilisiert.

2.2.11 Generelle Synthese von Acryl-, Crotonsäure- und 3-Methylcrotonsäure-HFIP-Estern (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)

5 mmol Acrylsäure (Crotonsäure oder 3-Methylcrotonsäure), 6 mmol Hexafluorisopropanol (HFIP) und 1 mmol 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) werden in 10 ml wasserfreiem DCM aufgelöst. Unter ständigem Rühren wurden 6 mmol 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC HCl) in einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit DCM verdünnt. Nach Extraktion mit verdünnter Zitronensäurelösung wurde die organische Phase abgetrennt, zweimal mit dH₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft, wobei der rohe HFIP-Ester als Flüssigkeit erhalten wurde.

2.2.12 Generelle Synthese von (R/S)-3-(n-Dodecylthio)propionyl(butyroyl)-Derivaten SD-1-10 (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)

Für die Michael-Addition wurden 0.33 mmol des entsprechenden HFIP-Esters, 0.4 mmol 1-Dodecanethiol und 0.4 mmol TEA gemischt (in einigen Fällen wurde DCM zugesetzt, um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (bei HFIP 3-Methylcrotonat wurde das Reaktionsgemisch 2 Tage inkubiert). Am nächsten Tag wurden acht Äquivalente DIPEA und DMF zugegeben und die Lösung über Nacht mit dem Harz inkubiert (für 3-Methylbutyroyl-Derivate wurden 2.5 mg 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) zugegeben und die Reaktionszeit auf 2 Tage ausgedehnt).

2.2.13 Synthese des Phytanoylderivats SD-7 (synthetisiert von Dr. Marat Meleshin)

Zu 100 mg des harzgebundenen Peptids wurde eine Lösung von 0.016 mmol Phytansäure (Cayman Chemical), ein Äq PyBOP und drei Äq DIPEA in 400 µl DMF gegeben, woraufhin der Reaktionsansatz über Nacht inkubiert wurde. Anschließend wurde das Harz wie in Methode 2.2.14 beschrieben, behandelt.

2.2.14 Generelle Abspaltung der Peptid- und Lysin-Derivate

Nach entsprechender Modifizierung des Lysinrestes wurde das Harz nacheinander mit DMF (alle Peptide mit 3-Nitrotyrosinrest wurden vor dem Waschschrift zweimal mit einer 20 %igen Piperidinlösung behandelt, um die Acylgruppe von diesem Rest zu entfernen), DCM, Methanol und erneut mit DCM (je fünf Mal für 4 min) gewaschen und durch zweimalige Inkubation mit einer TFA-Wasser-Lösung (95:5 v/v) für jeweils 1 h lang vom Harz abgespalten. Die kombinierten TFA-Lösungen wurden eingedampft und in Essigsäure resuspendiert. Nach der Reinigung mittels *reversed phase*-HPLC wurden die gesammelten Fraktionen unter Verwendung einer UPLC-MS analysiert und die Fraktionen, die das Zielpeptid enthielten, vereinigt und lyophilisiert.

2.3 Methoden – Messverfahren

2.3.1 HPLC-Substrat Assay

Der Reaktionsansatz für den Stabilitäts- und Substrattest enthielt 10 µM Peptid-Derivat, 500 µM NAD⁺, 5 % DMSO, 1 µM SIRT2, SIRT3 oder SIRT5 und 0.2 mg/ml BSA im SIRT-puffer. (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ bei pH 7.8). Es wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt, eine ohne NAD⁺ (NKON) und eine ohne SIRTUIN (NKOE). Nach 24 h Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurden die Reaktionen durch Zugabe einer 10 % TFA/Wasser-Lösung abgestoppt (1:9 v/v).

Nach positivem Ergebnis des Stabilitäts- und Substrattests wurden v/[S]-Charakteristiken aufgenommen. Dafür wurden Reaktionsansätze bestehend aus 0.5-50 µM des jeweiligen Peptid-Derivates, 500 µM NAD⁺, 5 % DMSO, X µM SIRT2 oder SIRT3 (Abhängig von den kinetischen Eigenschaften des eingesetzten Peptid-Derivates) und 0.2 mg/ml BSA im SIRT-puffer angesetzt. Die Reaktionsansätze wurden durch Zugabe von SIRTUIN gestartet und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Innerhalb von 60 min wurden die Reaktionen nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe einer 10 % TFA/Wasser-Lösung abgestoppt (1:9 v/v).

Die Proben wurden mittels RP-HPLC analysiert. Dies erfolgte unter Verwendung einer Phenomenex Kinetex XB C-18 Säule (2.6 µm, 3.0 × 50 mm, 100 Å) und einem linearen Gradienten von 5-95 % Acetonitril (ACN) in 6 min bei einer Flussrate von 0.6 ml/min und RT. Die Komponenten wurden entweder bei 220 nm oder bei 340/360 nm (Peptide mit 3-Nitrotyrosinrest im Rückgrat) detektiert und mit dem Programm Graphpad prism 8 und über Michaelis Menten ausgewertet. Alle Messungen wurden in technischen Doppelbestimmungen durchgeführt

2.3.2 HPLC-Inhibition Assay

Die Reaktionsansätze für den Inhibitionsassay mit SIRT5 enthielten 0 oder 50 μM Peptid-Derivat, 10 μM Bz-GVLK(succinyl)EYGV-NH₂ ($K_M = 3.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$), 500 μM NAD⁺, 5 % DMSO, 0.1 μM SIRT5 in SIRT-Puffer (siehe 2.1.2). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SIRT5 gestartet und für 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und mit TFA/Wasser (1:9 v/v) abgestoppt.

Der Inhibitionsassay für SIRT2 erfolgte mit 0 oder 20 μM Peptid-Derivat, 500 μM NAD⁺, 5 % DMSO, 0,1 μM SIRT2 und verschiedenen Substrat-Peptiden in SIRT-Puffer. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SIRT2 gestartet. Für das erste Substrat-Peptid wurden die Peptid-Derivate und 20 μM Ac-EALPKK(Acetyl)Y(NO₂)GG-NH₂ ($K_m = 20.3 \pm 3.6 \mu\text{M}$) für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und für das zweite Peptid mit 3 μM Ac-EALPKK(Myristoyl)Y(NO₂)GG-NH₂ ($K_m = 0.63 \pm 0.07 \mu\text{M}$) für 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und mit TFA/Wasser (1:9 v/v) abgestoppt.

Für SIRT3 wurden die Reaktionen analog durchgeführt. Für das erste Substrat-Peptid wurden die Peptid-Derivate und 6 μM Ac-EALPKK(Acetyl)Y(NO₂)GG-NH₂ ($K_m = 6.84 \pm 0.83 \mu\text{M}$) für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Das zweite Substrat-Peptid wurde mit 1 μM Ac-EALPKK(Myristoyl)Y(NO₂)GG-NH₂ ($K_m = 0.59 \pm 0.07 \mu\text{M}$) für 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert

Die IC₅₀-Bestimmungen erfolgten für SIRT2 und SIRT3 analog zu den beschriebenen Inhibitionsassays. Davon abweichend wurden anstatt 0 und 20 bzw. 50 μM der Peptid-Derivate acht verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0 bis 50 μM eingesetzt.

Selektivitätstest: Für die Enzyme SIRT1 und SIRT6 enthielten die Reaktionsansätze 0 oder 50 μM Peptid-Derivat, 500 μM NAD⁺, 5 % DMSO, 0,1 μM SIRT1, 50 μM Bz-GVLK(Acetyl)EYGV-NH₂, 0.5 μM SIRT6 und X μM Ac-EALPKK(Myristoyl)Y(NO₂)GG-NH₂. Die Reaktionen wurden für 8 min (SIRT1) bzw. 6 min (SIRT6) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und mit TFA/Wasser (1:9 v/v) abgestoppt.

Die Proben wurden mittels RP-HPLC analysiert. Dies erfolgte unter Verwendung einer Phenomenex Kinetex XB C-18 Säule (2.6 μm , 3.0 × 50 mm, 100 Å) und einem linearen Gradienten von 5-95 % Acetonitril (ACN) in 6 min bei einer Flussrate von 0.6 ml/min und RT. Die Peptid-Derivate wurden entweder bei 220 nm oder 340/360 nm (Peptide mit 3-Nitrotyrosinrest im Rückgrat) detektiert und mit dem Programm Graphpad prism 8 ausgewertet. Alle Messungen wurden in technischen Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3.3 NAD⁺ prä-inkubations-experiment

Für diese Reaktionsansätze wurden 1 μM Peptid-Derivat und 0.1 μM SIRT2 mit und ohne 500 μM NAD⁺ bei RT inkubiert. Nach 15, 30 und 60 min wurde zu den Ansätzen ohne NAD⁺ dieses hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 3 μM Ac-EALPKK(Myristoyl)Y(NO₂)GG-NH₂ gestartet. Die Ansätze wurden für 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und mit TFA/Wasser (1:9 v/v) abgestoppt. Die Proben wurden mittels RP-HPLC analysiert. Dies erfolgte mit einer Phenomenex Kinetex XB C-18 Säule (2.6 μm , 3.0 × 50 mm, 100 Å) und einem linearen Gradienten von 5-95 % Acetonitril (ACN) in 6 min bei einer Flussrate von 0.6 ml/min und RT.

Die Peptid-Derivate wurden entweder bei 220 nm oder 340 nm (*Peptide mit 3-Nitrotyrosinrest im Rückgrat*) detektiert und mit dem Programm Graphpad prism 8 ausgewertet. Alle Messungen wurden in technischen Doppelbestimmungen durchgeführt

2.3.4 Fluoreszenz Inhibition Assay

Alle Messungen wurden in schwarzen 96-*well*-Microtiterplatten durchgeführt.

Die K_i -Wertbestimmung für SIRT5 enthielt 0.025-5 μM Substrat Abz-GVLK(Glutaryl)AY(NO₂)GV-NH₂ ($K_M = 0.54 \mu\text{M} \pm 0.09$), 500 μM NAD⁺, 500 nM Trypsin, 10 nM SIRT5, 5% DMSO und 0.01-20 μM Inhibitor (alle S5i-Peptid-Derivate) in SIRT-Puffer (siehe 2.1.2). Die Reaktionsansätze, bestehend aus Substrat, NAD⁺, Inhibitor und Puffer, wurden für 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsin und eine erneute Inkubation bei 37 °C für 5 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SIRT5 gestartet und für 45 Zyklen kontinuierlich verfolgt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Anregungswellenlänge (λ_{ex}) von 320 nm und einer Emissionswellenlänge (λ_{em}) von 420 nm gemessen. Alle Messungen wurden in technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt. [89] Die Messungen erfolgten am Plattenleser Tecan mit folgenden Geräteeinstellungen: *Gain: 50, Number of reads: 15, read mode: Top.*

Für die K_i -Wertbestimmung für SIRT2 gegen das Substrat-Peptid wurden 0.1-1.6 μM Substrat Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)TGG-NH₂[89], ($K_M = 0.12 \pm 0.05 \mu\text{M}$) 500 μM NAD⁺, 10 nM SIRT2, 0.2 mg/ml BSA, 5 % DMSO und 0.01-20 μM Peptid-Derivat in SIRT-Puffer eingesetzt. Für die K_i -Wertbestimmung gegen NAD⁺ enthielt jedes *well* 10-160 μM Co-Substrat NAD⁺ ($K_M = 325 \pm 58 \mu\text{M}$), 2 μM Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)TGG-NH₂, 10 nM SIRT2, 0.2 mg/ml BSA, 5 % DMSO und 0.01-20 μM Peptid-Derivat in SIRT-Puffer. Die Reaktionsansätze, bestehend aus Substrat, NAD⁺, Inhibitor und Puffer, wurden für 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SIRT2 gestartet und für 45 Zyklen kontinuierlich verfolgt. Die Fluoreszenz wurde mit einer λ_{ex} von 320 nm und einer λ_{em} von 420 nm gemessen. Die Messungen erfolgten am Plattenleser Tecan mit folgenden Geräteeinstellungen: *Gain: 50, Number of reads: 15, read mode: Top.*

Die IC₅₀-Wertbestimmungen für SIRT2 wurden mit 0.3 μM Substrat-Peptid und 500 μM NAD⁺, für SIRT3 mit 3,3 μM Substrat-Peptid und 500 μM NAD⁺, für SIRT6 mit 23.5 μM Substrat-Peptid und 2000 μM NAD⁺ und für SIRT5 mit 0,3 μM Abz-GVLK(Glutaryl)AY(NO₂)GV-NH₂, 1000 μM NAD⁺ und 0.5 μM Trypsin bestimmt und anhand Gleichung 1 (log Inhibitor vs, normalisierter Aktivität) mittels Graphpad prism 8 berechnet. Alle Messungen wurden in technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt.

$$\text{Gleichung 1} \quad Y = \frac{100}{(1+10^{(X-\log IC_{50})})}$$

Die inhibitorische Aktivität aller Derivate wurde unter folgenden Bedingungen getestet: 0 oder 20 μM Peptid-Derivat, 500 μM NAD⁺, 5 % DMSO, 0.01 μM SIRT2 und 0.3 μM Substrat-Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)TGG-NH₂ in SIRT-Puffer bzw. 0 oder 20 μM Inhibitor, 500 μM NAD⁺, 5 % DMSO, 0.1 μM SIRT3 und 3 μM Substrat-Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)TGG-NH₂ bzw. 0 oder 50 μM Peptid-Derivat, 500 μM NAD⁺, 5 % DMSO, 0.01 μM SIRT5, 0.5 μM Trypsin und 0.3 μM Substrat-Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)TGG-NH₂ in SIRT-Puffer.

2.3.5 Trypsininhibierung

Alle SIRT5 Peptid-Derivate mit inhibitorischer Wirkung wurden mittels MTPR-Messungen dahingehend untersucht, ob diese Derivate nur SIRT5 inhibieren oder auch die katalytische Aktivität von Trypsin. Für die Reaktionsansätze wurden 50 μM Peptid-Derivat, 10 μM Abz-GVLKAY(NO₂)GV-NH₂ und 5 % DMSO in SIRT-Puffer vorgelegt. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37 °C erfolgte durch Zugabe von 0,1 μM Trypsin der Start der Reaktion. Die Reaktion wurde im Mikrotiterplattenleser für 15 Zyklen kontinuierlich gemessen. Die Anregungswellenlänge lag bei $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ und die Emissionswellenlänge bei $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$. Alle Messungen wurden in technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.3.6 Microscale Thermophorese (MST)

Die K_D -Wert-Messungen erfolgten mit dem Monolith NT.115 (Nanotemper) und Standard kapillaren (MO-K022). Die Reaktionsansätze bestanden aus einer Verdünnungsreihe (1:1) von NAD⁺ (0.00954-625 μM), NAM (0.0763-1250 μM) oder ADPr (0.763-2500 μM) in MST-Puffer (137 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) mit 0.05 % Tween20 in einem Volumen von 10 μl . Die Reaktionsansätze für die Peptid-Derivate bestanden aus einer Verdünnungsreihe aus 16 Ansätzen (1:1) des jeweiligen Peptid-Derivates, 0,2 mg/ml BSA und 5 % DMSO in SIRT-puffer in einem Volumen von 10 μl .

Histag-SIRT2 wurde mit dem DYE aus dem Nanotemper Kit (His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation Monolith/MO-L018) im Verhältnis 2:1 (50 nM SIRT2 : 25 nM DYE) gelabelt [92] und 10 μl in jeden Ansatz der Verdünnungsreihe gegeben. Die Endkonzentration des Fluoreszenz-gelabelten Histag-SIRT2 betrug 25 nM. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben in die Kapillaren überführt und bei 37 °C mit dem Filter Nano-RED ($\lambda_{\text{ex}} = 600\text{-}640 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 660\text{-}720 \text{ nm}$) vermessen (*excitation power* 60 %, *MST power* 60 %).

Umgekehrt bestanden die Reaktionsansätze von SIRT2, SIRT3, SIRT5 und SIRT6 aus einer Verdünnungsreihe (1:1) dieser Enzyme mit 0.2 mg/ml BSA und 5 % DMSO in SIRT-Puffer mit einem Volumen von 10 μl . In jeden Ansatz der Verdünnungsreihen wurden 10 μl 80 nM S2i-CF-1, S2i-CF-12, S2i-CF-13 oder SD-CF-3 (Endkonzentration = 40 nM) gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben in die Kapillaren überführt und bei 37 °C mit dem Filter Nano-BLUE ($\lambda_{\text{ex}} = 450\text{-}480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}570 \text{ nm}$) vermessen (*excitation power* 40 %, *MST power* 40 %).

Für die Selektivitäts- und Verdrängungsexperimente wurden Verdünnungsreihen (1:1) von 0.000381-12,5 μM SIRT2, SIRT3, SIRT5 und SIRT6 in SIRT-Puffer mit 0.2 mg/ml BSA und 5 % DMSO in einem Volumen von 10 μl angefertigt. Zusätzlich wurden 500 oder 2000 μM NAD⁺, NAM, oder ADPr bzw. 200 nM S2i-1 oder 0.3 μM Substrat-Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz oder Myristoyl oder Acetyl)Y(NO₂)TGG-NH₂ hinzugegeben. Danach wurden jeweils 10 μl 80 nM Peptid-Derivat S2i-CF-1, S2i-CF-12 oder S2i-CF-13 zu der Verdünnungsreihe hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert (Endkonzentration der FL-Peptide = 40 nM). Die Proben wurden in die Kapillaren überführt und bei 37 °C mit dem Filter Nano-BLUE ($\lambda_{\text{ex}} = 450\text{-}480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}570 \text{ nm}$) vermessen (*excitation power* 40 % (S2i-CF-12, S2i-CF-13) bzw. 80 % (S2i-CF-1), *MST power* 40 %). Die Ergebnisse wurden über die MST-Kurven oder das Fluoreszenzsignal mittels der *MO.Affinity Analysis* Software (Nanotemper) ausgewertet. Alle Peptid-Derivate, die eine Fluoreszenzänderung zeigten, wurden mittels SD-Test überprüft, ob dieser Ligand induziert, Also eine Bindungsabhängige Fluoreszenzänderung, war.

Für den SD-Test wurden Ansatz 1-3 und 14-16 aus der entsprechenden Verdünnungsreihe für 10 min bei 15000 g zentrifugiert und 7 µl von jeder Probe mit 7 µl SDS-mix (4 % SDS und 40 mM DTT) versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert und unter den gleichen Bedingungen wie dem dazugehörigen K_D -Experiment gemessen. Alle Messungen wurden in technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die kinetischen Parameter wurden über *MO.Affinity Analysis* (Nanotemper) ermittelt. Die K_D -Werte wurden über Gleichung 2 und die EC_{50} -Werte der Verdrängungsexperimente über Gleichung 3 berechnet.

Gleichung 2:

$$f(c) = U + \frac{(G - U) \times (c + target + K_D - \sqrt{((c - target + K_D)^2 - 4 \times c \times target)})}{2 \times target}$$

Gleichung 3:

$$f(c) = U + \frac{(G - U)}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^{Hill\ Koeffizient}}$$

| | |
|------------------|--|
| K_D | Dissoziationskonstante |
| EC_{50} | mittlere effektive Konzentration für den halbmaximalen Effekt |
| U | ermittelter Wert des ungebundenen Status |
| G | ermittelter Wert des gebundenen Status |
| c | Konzentration des Liganden aus der Verdünnungsreihe |
| <i>target</i> | Konzentration des Fluoreszenz gelabelten Peptids oder Proteins |
| Hill Koeffizient | Anstieg der ermittelten Kurve die den Hillkoeffizienten (Kooperativ) Widerspiegelt |

2.3.7 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (surface plasmon resonance spectroscopy = SPR)

Die SPR Messungen wurden unter Verwendung eines BIAcore X (BIAcore, Uppsala, Sweden) durchgeführt. Für die SIRT5 Messungen wurde das biotinylierte Peptid-Derivat S5i-BT-33(S) (100 µM in PBS-Puffer (siehe 2.1.2)) auf einem SAHC 200 M Sensorchip (Xantec, Düsseldorf, Germany) immobilisiert und SIRT5 in einer Verdünnungsreihe in PBS-Puffer) injiziert. Umgekehrt wurde N-terminal biotinyliertes SIRT5 auf einen Streptavidin-beschichteten Sensorchip immobilisiert, bis der Beladungsgrad ca. 1800 *response units* (RU) betrug. In diesem Fall wurde daraufhin 50 nM Peptid-Derivat S5i-33(S) injiziert.

Die Komplexbildung (Assoziation/Dissoziation) wurde bei einer kontinuierlichen Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ verfolgt. Nach jeder Messung wurde die Matrix mit 100 μl 200 mM NaOH regeneriert. Für die SIRT2 Messungen wurde das biotinylierte Peptid-Derivat S2i-BT-1, S2i-BT-11 oder S2i-BT-12 (10 μM in PBS Puffer) immobilisiert und SIRT2 in einer Verdünnungsreihe von 50-1000 nM in PBS Puffer mit 0.1 % Tween20 injiziert. Für die Selektivitätsmessungen wurden SIRT1 (erworben bei Enzolifescience), SIRT3, SIRT4, SIRT5 und SIRT6 mit einer Konzentration von jeweils 1 μM injiziert und die Komplexbildung kontinuierlich bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ verfolgt. Nach jeder Messung wurde die Matrix mit 100 μl 200 mM NaOH (S2i-BT-1 und S2i-BT-11) oder 1000 mM Guanidin (S2i-BT-12) mit 0.05 % Triton X-100 regeneriert. Alle Messungen wurden in technischen Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die kinetischen Parameter wurden mit dem 1:1 Langmuir *binding model* (Gleichung 4) mit der BIAevaluation Software (BIAcore) berechnet.

Gleichung 4a: wenn $t = t_0$ nach Dissoziation

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \times \frac{k_{on}C}{k_{on}C + k_{off}} (1 - e^{-(k_{on}C + k_{off})t})$$

Gleichung 5b: wenn $t < t_0$ nach Dissoziation

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \times \frac{k_{on}C}{k_{on}C + k_{off}} (1 - e^{-(k_{on}C + k_{off})t_0}) e^{-k_{off}(t-t_0)}$$

| | |
|------------|---|
| Γ_0 | für $t > t_0$: maximale Oberflächenmassendichte der in Lösung befindlichen Probe, (abhängig von <i>target</i> Dichte, molekularer Oberfläche, Orientierung auf der Oberfläche) variiert von Kurve zu Kurve |
| $k_{on}C$ | Geschwindigkeitskonstante für in Lösung befindliche Probe, die an immobilisiertes <i>Target</i> bindet, wobei C die Konzentration der Probe darstellt |
| k_{off} | Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation in Lösung befindlichen Probe vom immobilisierten <i>Target</i> (unabhängig von C) |
| t | Oberflächenmassendichte gesamt |
| t_0 | Oberflächenmassendichte des immobilisierten <i>Target</i> vor Beladung der ersten in Lösung befindlichen Probe |

2.3.8 Thermostabilität (durchgeführt von Dr. Sandra Liebscher)

Die thermische Entfaltung und Aggregation wurde mit einem Prometheus NT.48 (Nanotemper) gemessen. Die thermische Entfaltung von SIRT2 ($c=10 \mu\text{M}$) wurde Fluoreszenzbasiert von 20 bis 80°C in Gegenwart bzw. Abwesenheit von NAD^+ ($c=500 \mu\text{M}$) und dem entsprechenden Inhibitor ($c=50 \mu\text{M}$) in PBST gemessen. Alle Komponenten wurden für 10 Minuten bei 20°C vorinkubiert. Die Messungen wurden in einer technischen Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.4 Methoden – Biologische Verfahren

2.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen (durchgeführt von Dr. Sandra Liebscher)

Humanes Sirt5 wurde mit einem *N*-terminalen *StrepII*-tag in einen pET-21a(+) Vektor kloniert, während für Sirt2₄₃₋₃₅₆, Sirt3₁₁₄₋₃₈₀ und Sirt6 mit *N*-terminalen *StrepII*-tag ein pET-28a(+)-Vektor verwendet wurde. Alle Proteine wurden mittels Biosynthese in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt, wobei LB-Medium versetzt mit Ampicillin oder Kanamycin verwendet wurde. Die Überexpression wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Bei einer OD₆₀₀ wurden die Zellen geerntet, in Lysis Puffer (100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert und mittels Ultraschall lysiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand auf eine StrepTrap™ Säule (GE healthcare, Uppsala, Sweden) geladen. Die beladene Säule wurde vor der Elution mehrmals mit 5 mM Desthiobiotin in 100 mM Tris, 250 mM NaCl pH 8,0 gewaschen. Sirt5-haltige Fraktionen wurden mit einer Superdex 75 5/150 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) konzentriert und weiter gereinigt. Die Expression von SIRT4 wurde mit dem IMPACT™-System (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Das entsprechende Gen wurde anhand der Restriktionsenzyme SapI/PstI in pTWIN2 kloniert und in *E. coli* ER2566 (NEB) transformiert. Die Überexpression wurde durch die Zugabe von IPTG (0.5 mM Endkonzentration) bei einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 16 °C für 12 Stunden induziert. Die Affinitätschromatographie unter Verwendung der Chitin-bindenden Domäne wurde wie im *Manual* beschrieben durchgeführt. Die enzymatische Aktivität der exprimierten Sirtuin-Isoformen wurde, wie in der Literatur beschrieben, bestimmt. [93] Die Biotinylierung von Sirt5 wurde über Trypsinligase unter Verwendung von Biotinyl-4-guanidino-phenylester, in der Literatur beschrieben, durchgeführt. [93]

Humanes SIRT2₄₃₋₃₅₆ mit *N*-terminalem Hexahistidin-Tag (MHHHHHGS-SIRT2₄₃₋₃₅₆) wurde durch ortsgerichtete Mutagenese unter Verwendung des zuvor erwähnten *Strep*-SIRT2-Gens mit pET28a-Vektor erzeugt. Das resultierende Plasmid wurde in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die Expression in Kanamycin-haltigem LB-Medium wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG bei OD₆₀₀ (T=37°C) induziert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0 mit 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol und 5 mM DTT (Bindungspuffer) resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mittels einer *French Press* durchgeführt und Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Der Überstand wurde auf eine HisTrap™-Säule (Cytiva, Marlborough, USA) geladen. Die Säule wurde vor der Elution mit 500 mM Imidazol in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit 500 mM NaCl und 5 mM DTT mehrmals mit Bindungspuffer gewaschen. His6-SIRT2-haltige Fraktionen wurden mit einer Superdex 75 5/150 Gelfiltrationssäule (Cytiva) konzentriert und weiter gereinigt.

2.4.2 Affinity pull down Experiment (durchgeführt von Dr. Sandra Liebscher)

Chromatographiesäulen mit 0.4 ml Bettvolumen (0,5 ml für biotinylierten Inhibitor S5i-BT-33(S)) Avidin-konjugierter Agarose (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurden mit 5 CV PBS äquilibriert, woraufhin der biotinylierte Inhibitor S5i-BT-33(S) bzw. S2i-BT-1 (100 µM in PBS, 2% (v/v) DMSO) aufgetragen wurde. Nach 30 min Inkubation wurde die Agarose mit 10 CV PBST (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, 0,05% Tween pH 7.4) gewaschen, mit Biotin (200 µM in PBS) blockiert und schließlich mit 10 CV PBST gewaschen.

Als Proteinproben wurden Pellets von 50 ml (S2i-BT-1) bzw. 20 ml (S5i-BT-33(S)) einer Zellkultur mit induzierten *E.coli* BL21 (DE3) Zellen, die Sirt2 exprimieren, in 100 mM Tris, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT pH 8,0 resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Nach Entfernung der Zelltrümmer wurde der Überstand auf die Inhibitormatrix aufgetragen. Die konjugierten Agarose-Perlen wurden mit 6 x 3 CV PBST gewaschen. Gebundenes Protein wurde durch Zugabe von 200 mM NaOH eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-Page und LC-MS analysiert. Es wurde eine Proteinnischung mit SIRT2, SIRT3, SIRT5 und SIRT6 hergestellt, die in *E.coli* exprimiert und anschließend bis zur Homogenität gereinigt wurde. Die Proteinkonzentration jedes Sirtuins betrug 20 µM in PBS. Waschen und Elution erfolgten wie für das *E. coli*-Zelllysate beschrieben.

2.4.3 Stabilität im humanen Serum (durchgeführt von Dr. Sandra Liebscher)

Die Analyse der Stabilität der Verbindungen in humanen Serum wurde wie in [94] beschrieben, durchgeführt. 400 µl männliches Humanserum wurden bei 37°C mit 150 µM des Inhibitors inkubiert. Proben von 45 µl wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mit 50 µl wässrigem Harnstoff (6 M) und 100 µl Acetonitril gequenchet. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben mittels HPLC analysiert. Die Peakflächen der Verbindungen wurden integriert. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

2.5 Methoden – Kristallstrukturanalyse (Kooperation mit AG Steegborn, Heidelberg)

Das zSirt5-Protein wurde durch Co-Talon-Affinitätschromatographie, TEV-Proteolyse, umgekehrte Affinitätschromatographie und Gelfiltration wie beschrieben gereinigt, wobei dem Gelfiltrationspuffer 0.5 mM TCEP hinzugefügt wurde. Zur Kristallisation wurde zSirt5 (10 mg/ml) mit 1 mM inhibitorischem Peptid (20 mM Stammlösung in DMSO) gemischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Die Komplexe wurden als 2 µl *Sitting-Drop*-Dampfdiffusionsexperiment bei 20 °C unter Verwendung von 20 % PEG8000, 0.2 M MgCl₂, 0.1 M Tris/HCl pH 8.5, 0.1 M Glycin als Reservoirlösung kristallisiert. Nach 2-4 Tagen wurden die Kristalle in eine Kryo-Schutzlösung aus Reservoir und Ligand überführt und mit 25% Glycerin ergänzt. Die erhaltenen Kristalle wurden schockgefroren und die Beugungsdaten, bei 100 K an der BESSY II Beamline MX14.1 (betrieben vom Helmholtz-Zentrum Berlin, Deutschland) mit einem Pilatus 6M-Detektor (Dectris, Baden, Schweiz) gesammelt. Indexierung, Skalierung und Zusammenführung wurden in XDS durchgeführt und Strukturen durch molekularen Ersatz mit dem Suchmodell PDB 4UTV (zSirt5/3-phenyl-succinyl-CPS1) gelöst. Die Verfeinerung erfolgte mit Refmac5 und die manuelle Modellierungsstrukturvalidierung mit Coot. Geometrieparameter für die modifizierten Lysine wurden mit PRODRG generiert.

2.6 Docking-Studien

2.6.1 SIRT5 (Kooperation mit AG Sippl)

Die Molekularstrukturen aller in dieser Arbeit beschriebenen Peptid-Derivate für SIRT5 wurden mit dem Programm MOE 2014.09 (Chemical Computing Group, Montreal, Kanada) erstellt (Molecular Operating Environment (MOE)).^[95] Die anfänglichen Konformationen ergaben sich aus der Energieminimierung unter Verwendung des Amber12:EHT-Kraftfelds, wie es in MOE implementiert ist. Die Kristallstruktur von zSirt5 im Komplex mit den Peptiden S5i-2.2 und S5i-15.2 wurde für die flexible Docking-Studie herangezogen. Für die anschließenden Docking-Studien wurden alle Wasser- und Ligandenmoleküle entfernt, die Struktur protoniert und mit dem Amber12:EHT-Kraftfeld minimiert. Unter Verwendung von Goldscore als Fitnessfunktion wurde das ko-kristallisierte Peptid korrekt an die katalytische Stelle von zSirt5 andockt, (RMSD-Werte von 1,25 Å (2,2) bzw. 1,41 Å) ^[96]. Alle getesteten Peptide wurden an beide Kristallstrukturen andockt und 100 Docking-Posen wurden gespeichert. Die resultierenden Posen wurden mit dem Amber12:EHT-Kraftfeld und dem MM-GB/SA-Ansatz neu bewertet. Partielle Ladungen wurden mit dem MOE Protonate3D Tool entsprechend dem verwendeten Kraftfeld fixiert, gefolgt von einer kurzen Minimierung. Ein firmeninternes Skript zum Rescoring der zSirt5-Ligandenkomplexe und zur Berechnung der freien Bindungsenergien wurde für die Docking-Posen der Liganden verwendet. Während der Komplexminimierung wurden die schweren Atome des Proteins mit einer Abweichung von 0,5 Å (Kraftkonstante $(3/2) \text{ kT} / (0,5)^2$) gebunden. Die Komplexe, die die günstigste MM-GB/SA-Energie aufwiesen, wurden ausgewählt und mit dem Programm MOE visuell analysiert.

2.6.2 Docking Studien. SIRT2 (Kooperation mit AG Sippl)

Die Kristallstruktur von humanem SIRT2 im Komplex mit myristoyliertem Peptid (PDB ID: 4Y6O)⁵⁸ und im Komplex mit SirReal2 und NAD⁺ (PDB ID: 4RMG) ^[23] wurde aus der Proteindatenbank (PDB, www.rcsb.org) entnommen.^[92] Computergestützte Studien wurden mit der Schrödinger-Suite durchgeführt. ^[93] Das Protein wurde mit dem Protein Vorbereitungsassistenten durch Hinzufügen der Wasserstoffatome und fehlender Aminosäureseitenketten vorbereitet. Die Lösungsmittelmoleküle wurden mit Ausnahme eines Wassermoleküls (W101 in Kette C) entfernt. Protonierungszustände und tautomere Formen der Reste wurden mit dem PROPKA-Tool bei pH 7,0 sortiert. Die Proteinstruktur wurde mit dem OPLS3e-Kraftfeld⁶¹ minimiert, indem die schweren Atome auf einen RMSD von 0,30 Å konvergiert wurden. Das Tool LigPrep wurde zur Vorbereitung der Liganden durch Anwendung des OPLS3e-Kraftfelds verwendet. Anschließend wurden die vorbereiteten Liganden dem Konformationssampling unterzogen, indem für jeden Liganden 64 Konformer erzeugt wurden und die Minimierung mit dem OPLS3e-Kraftfeld auf den Konformeren mithilfe des ConfGen-Tools aktiviert wurde. Für das Docking wurden Gitterdateien mit dem Peptidschwerpunkt und einer Boxgröße von 20*20*20 Å generiert. Die anderen Einstellungen wurden als Standard verwendet. Molekulare Docking-Studien wurden im Standard-Präzisionsmodus (SP) mit dem Programm Glide durchgeführt. Während des Dockings wurden die Einstellungen für flexibles Ligandensampling und verbesserte Planarität konjugierter Pi-Gruppen aktiviert. Die Kernbeschränkung wurde unter Verwendung des folgenden SMARTS-Musters angewendet:

"O=CN([H])CCCC(C(=O)N([H])C(C(=O)N([H])C(C)O[H])N([H])C(=O)C(N([H])C=O)CCCC[N+])([H])([H])[H])" (gesamte Tripeptidstruktur außer der Acylgruppe des zentralen Lysins). Durch die Anwendung der Post-Docking-Minimierung wurden drei Posen pro Ligand erzeugt. Zur Validierung des Docking-Protokolls wurden Re-Docking-Studien durchgeführt. Die neu andockte Pose des myristoylierten Peptids zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem in der Kristallstruktur beobachteten Bindungsmodus (RMSD: 0,025 Å). Die Bilder wurden mit der MOE-Software erstellt. ^[97]

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Peptid-Derivate mit inhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT5

Alle Ergebnisse in diesem Abschnitt der Arbeit wurden in Kalbas et al. (2018) veröffentlicht

Der 3-Phenylsuccinyl-Anteil an einer Lysin-Seitenkette stellt einen spezifischen SIRT5-Inhibitor dar, der durch Blockierung der NAD⁺-Bindungstasche wirkt. [84] 3-Phenyl-3-Methyl-succinyl-CPS1 ist einer der wirksamsten und selektivsten SIRT5-Inhibitoren mit einem K_i-Wert von 4.3 μM. Der Assay, der hauptsächlich für die hier beschriebenen S5i-Peptid-Derivate verwendet wurde, wurde in Rössler et al. (2014) etabliert. Zuerst wurden die optimalen kinetischen Bedingungen für Peptid-Substrat und das Co-Substrat NAD⁺ gegen SIRT5 vermessen. Für die nachfolgenden IC₅₀ Messungen wurden 0.3 μM Peptid (K_M Bereich) und 1 mM NAD⁺ (Sättigungsbereich ohne Substratüberschusseffekt) verwendet. Die IC₅₀-Ergebnisse für aller S5i-Derivate sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

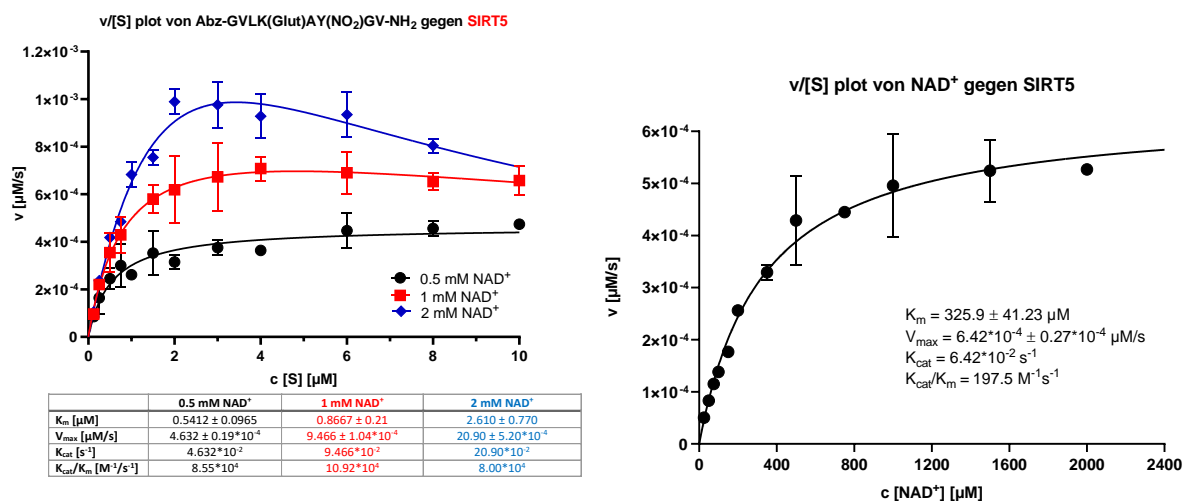


Abbildung 10: Ermittlung der kinetischen Eigenschaften für die optimalen Bedingungen für nachfolgende Inhibitor Messungen [Links] Vergleich der kinetischen Eigenschaften des Fluoreszenzpeptids mit verschiedenen NAD⁺ Konzentrationen [Rechts] v/s Plot von NAD⁺ gegen SIRT5

Die Untersuchung der Kristallstruktur von Zebrafisch-Sirt5 (zSirt5) im Komplex mit dem strukturell ähnlichen, von der 3-Phenylsuccinyl-Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS1) abgeleiteten Peptid aus [84] (47; PDB ID 4UTV) ergab, dass der Phenylring am Succinylrest auf die Nikotinamid-Bindungstasche (C-Bindetasche) zeigt, aber nicht in der Lage ist, diese auch zu erreichen. [84] Daher wurde mit der Synthese und Analyse eines 3-Benzylsuccinyl-Derivate des CPS1-Peptids begonnen, was zu Derivat S5i-1 (Tab. 4) mit einem K_i-Wert von 263 ± 48 nM führte (Tab. 5). Die Reaktion von substituierten Bernsteinsäureanhydriden mit der Lysin-Seitenkette ist eine simple Strategie 3-Alkyl(aryl)-succinylpeptid-Derivate zu synthetisieren. Da der Zugang zu solchen Reagenzien jedoch begrenzt und die Regioselektivität der Reaktion unzureichend ist, da häufig 2-substituierte Regioisomere durch alternative Öffnung des Anhydrids gebildet werden, wurde ein alternativer Weg zum Ersatz von Succinylpeptiden untersucht. Maleaminsäure-Derivate reagieren mit Mercaptanen, wobei 2-(Alkylmercapto)-Bernsteinsäure als einziges Produkt entsteht. [98]

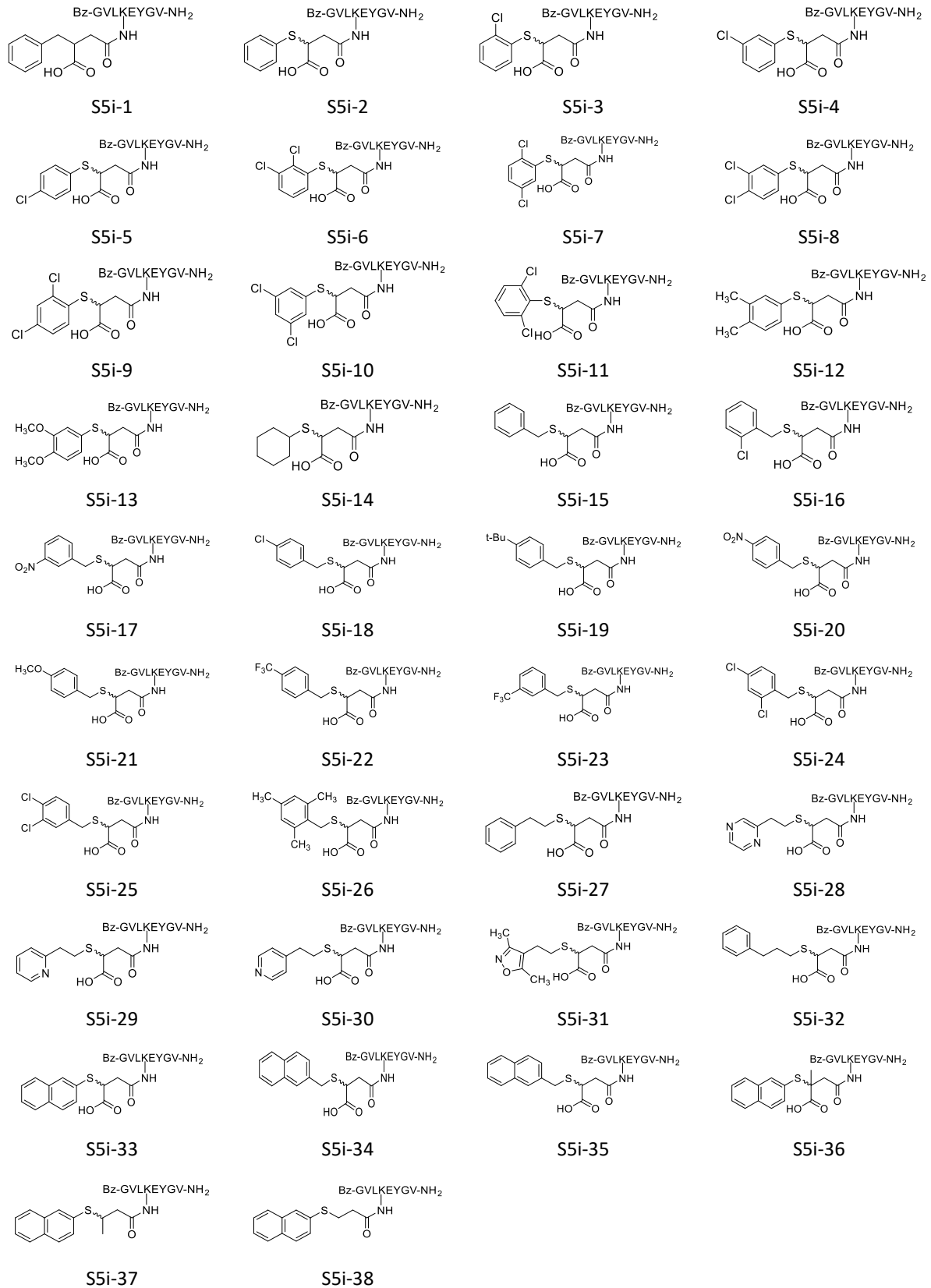
Da eine große Anzahl von Mercaptanen im Handel erhältlich ist und die entsprechende Michael-Addition direkt auf Resin-Harz durchgeführt werden kann, wurde diese Methode für die Herstellung einer Bibliothek von 3-substituierten Succinyl-CPS1-Peptiden gewählt (Methode 2.2.5). Die Behandlung von harzgebundenen maleylierten Peptiden mit einem Mercaptan in Gegenwart einer tertiären Base ergab die erwarteten Diastereomermischungen von 3-substituierten Zielpeptiden zusammen mit geringen Mengen von 2-substituierten Regioisomeren. Die Behandlung mit Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur führte zu vier Diastereomeren/Regioisomeren.

Die Reaktionsprodukte ließen sich mit der präparativen HPLC leicht trennen, wodurch wir (*S*)-3- und (*R*)-3-(Alkyl(aryl)Mercapto)succinyl-CPS1-Peptid-Derivate erhalten konnten. Die 2-substituierten Derivate entstanden nur in geringen Mengen und wurden nicht isoliert. Für eine geordnetere Übersicht bezeichnen wir untrennbare gleiche Mischungen von Diastereomeren als Zahl **S5i-N** und eher und später eluierende Diastereomere als **S5i-N.1** bzw. **S5i-N.2**. Anhand dieser Reaktion wurde der Acylrest der CPS1-Peptid-Derivate systematisch optimiert (Tab. 4), was zu einem IC₅₀-Wert 15.4 nM und daraus berechneten K_i-Wert von 7 nM für das Derivat **S5i-35.2** führte (berechnet über Cheng-Prusoff-Gleichung [99]) (Tab. 5).

Derivat **S5i-2** zeigte einen ähnlichen K_i-Wert wie Derivat **S5i-1**. Es zeigte sich, dass das später eluierende Diastereomer aufgrund der Substitution an Position 3 des Succinylrestes **S5i-2.2** ein effizienterer Inhibitor für SIRT5, mit einem K_i-Wert von 135 nM ist. Mit der Einführung von ein, zwei oder drei Methylengruppen zwischen dem Schwefel und dem Phenylring, entstanden die Peptid-Derivate **S5i-15**, **S5i-27** bzw. **S5i-32**. Für diese Peptid-Derivate hat sich das Inhibitionspotential nicht verbessert. Auch der Ersatz des Phenylrings durch Heterocyclen (Peptid-Derivat **S5i-28** bis **S5i-31**) führte zu Inhibitoren mit K_i-Werten zwischen 3.5 und 11 μM. Um die Interaktionen der **S5i**-Peptid-Derivate besser analysieren zu können, wurden die Kristallstrukturen von **S5i-15** bzw. **S5i-2** im Komplex mit zSirt5 (Abb. 11 und Tabelle S7) gelöst und mit der zuvor gelösten Struktur von zSirt5/47[84] (PDB ID 4UTV) verglichen. Die Substituenten an 3-Position der Succinylgruppe besetzten unterschiedliche Bindungstaschen (Abb. 11). Die Benzylgruppe von **S5i-15** ist ähnlich wie der Phenylring von 3-Phenyl-3-Methyl-succinyl-CPS1 aus [84]. in Richtung der C-Bindetasche ausgerichtet. Sie reicht tiefer in die Bindetasche hinein, kann sie aber dennoch nicht vollständig ausfüllen. Im Gegensatz dazu ist die Phenylgruppe von **S5i-2** auf einen hydrophoben Bereich ausgerichtet, der von Ala₇₈ und Phe₂₁₉ gebildet und durch Umlagerungen der Cofaktor-Bindungsschleife geöffnet wird. Offensichtlich können beide Stellen Wechselwirkungen für eine starke Bindung und damit effektive Inhibition bieten. Um die Bindung des Phenylrings von Derivat **S5i-2** genauer zu analysieren, wurden die möglichen Monochlor- und Dichlor-substituierten Peptid-Derivate hergestellt, woraus die Peptid-Derivate **S5i-3** bis **S5i-11** resultierten. Die Substitution in der *op*-Position scheint nicht vorteilhaft zu sein (Tab 4), da sie zu sterischen Konflikten mit dem Protein führen könnten (Abb. 11).

Der Ersatz von Wasserstoff durch Chlor in der *m*- oder *p*-Position führte zu Inhibitoren mit K_i-Werten zwischen 50 und 60 nM für das besser bindende Diastereomer. Diese Verbesserung der Bindung ist möglicherweise auf günstige Wechselwirkungen mit den SIRT5-AS Phe₆₆ und Arg₆₇ zurückzuführen (Abb.11). Die Chlorsubstitution sowohl in der *p*- als auch in der *m*-Position führte zu Derivat **S5i-8**, mit einem K_i-Wert von 23 nM für Derivat **S5i-8.2**. Das flexible Andocken von **S5i-8.2** an die Kristallstruktur von zSirt5, welches mit **S5i-2** co-kristallisiert wurde, zeigte, dass der Dichlorphenylring perfekt in die hydrophobe Tasche zwischen Arg₆₇ und Phe₂₁₉ passt (Abb. S115). Eine kombinierte *m*- und *p*-Substitution mit Methyl- (**S5i-12**) und Methoxy-Gruppen (**S5i-13**) führte zu ähnlichen SIRT5-Affinitäten.

Tabelle 4: S5i-Peptid-Derivate basierend auf Carbamoyl Phosphate Synthetase (CPS1) Sequenz, zur Vereinfachung sind die Racemere dargestellt und nicht die einzelnen R und S-Isomere



Inspiziert von diesem Substitutionsmuster wurde das 3-(2-Naphthylmercapto)succinyl-Derivat **S5i-33(S)** synthetisiert, welches den effizientesten Sirt5-Inhibitor mit der 3-(Arylmercapto)succinyl-Modifikation darstellte (IC_{50} -Wert = 40 nM). Darüber hinaus war **S5i-33(S)**, selektiv für Sirt5, was durch die Tatsache belegt wurde, dass eine Konzentration von bis zu 50 μ M keine Auswirkungen auf die durch SIRT1, SIRT2, SIRT3 oder SIRT6 vermittelte Katalyse hatte ([Abbildung S59](#)). Der Austausch des Arylrings in **S5i-2** durch einen Cyclohexylring (**S5i-14**), führte zu einem etwa 500-fach verschlechterten IC_{50} -Wert der resultierenden Diastereomere .

Der IC_{50} -Wert des wirksameren Diastereomers des 3-(Benzylthio)succinylderivats **S5i-15.2** ist mit dem IC_{50} -Wert des 3-(Phenylmercapto)succinylderivats **S5i-2.2** vergleichbar.

Tabelle 5: IC_{50} Werte aller **S5i**-Peptid-Derivate

| S5i- | IC_{50} [nM] | S5i- | IC_{50} [nM] | S5i- | IC_{50} [nM] | S5i- | IC_{50} [nM] |
|-------------|----------------------|-------------|--------------------|-------------|----------------------|------------------|--------------------|
| 1 | 1122.0 \pm 168.4 | 11.2 | 576.8 \pm 77.9 | 21.2 | 1047.1 \pm 103.9 | 33.1 | 1181.0 \pm 312.8 |
| 2.1 | 1798.8 \pm 200.4 | 12.1 | 1258.9 \pm 153.2 | 22.1 | 2202.7 \pm 245.7 | 33.2 | 30.3 \pm 3.5 |
| 2.2 | 273,5 \pm 31.1 | 12.2 | 46.1 \pm 4.5 | 22.2 | 803.5 \pm 110.3 | 34.1 | 2196.2 \pm 612 |
| 3.1 | 3097.4 \pm 361.4 | 13.1 | 9078.2 \pm 745.2 | 23.1 | 1148.2 \pm 131.7 | 34.2 | 95.0 \pm 14.2 |
| 3.2 | 857.0 \pm 93.6 | 13.2 | 325.8 \pm 42.9 | 23.2 | 1124.6 \pm 141.0 | 35.1 | 207 \pm 21.1 |
| 4.1 | 1383.6 \pm 215.3 | 14.1 | > 14000 | 24.1 | 431.5 \pm 57.0 | 35.2 | 15.4 \pm 9.5 |
| 4.2 | 119.9 \pm 7.4 | 14.2 | > 4000 | 24.2 | 543.3 \pm 28.5 | 36.1 | 89.9 \pm 8.8 |
| 5.1 | 1614.4 \pm 187.1 | 15.1 | 644.1 \pm 112.5 | 25.1 | 779.8 \pm 40.0 | 36.2 | 59.0 \pm 5.8 |
| 5.2 | 101.9 \pm 9.5 | 15.2 | 335.7 \pm 39.7 | 25.2 | 739.6 \pm 37.9 | 37 | > 40000 |
| 6.1 | 3388.4 \pm 410.6 | 16.1 | 352.4 \pm 48.2 | 26.1 | 631.0 \pm 91.2 | 38 | > 40000 |
| 6.2 | 714.5 \pm 105.7 | 16.2 | 533.3 \pm 105.2 | 26.2 | 5200.0 \pm 640.4 | BT-33 | 91.1 \pm 14.1 |
| 7.1 | 1977.0 \pm 251.1 | 17.1 | 2673.0 \pm 405.9 | 27.1 | 591.6 \pm 68.0 | BT-33(S) | 19.1 \pm 14.1 |
| 7.2 | 295.1 \pm 39.1 | 17.2 | 2710.2 \pm 421.3 | 27.2 | 2741.6 \pm 350.5 | LKA-33 | 1075.4 \pm 117.7 |
| 8.1 | 1606.9 \pm 164.3 | 18.1 | 1020.9 \pm 169.4 | 28 | 22803.4 \pm 4586.4 | LKA-33(S) | 350.4 \pm 20.6 |
| 8.2 | 45.9 \pm 11.3 | 18.2 | 893.3 \pm 142.6 | 29 | 13243.9 \pm 1931.5 | SMa-33 | 7400 \pm 750 |
| 9.1 | 2013.7 \pm 586.7 | 19.1 | 1235.9 \pm 171.0 | 30 | 6966.3 \pm 1261.6 | S Mb-33 | 154000 \pm 19300 |
| 9.2 | 176.6 \pm 20.7 | 19.2 | 792.5 \pm 92.8 | 31.1 | 18492.7 \pm 3575.3 | S Mc-33 | 157200 \pm 18900 |
| 10.1 | 647.1 \pm 73.2 | 20.1 | 4027.2 \pm 445.4 | 31.2 | 8749.8 \pm 1989.4 | S Md-33 | 90000 \pm 12500 |
| 10.2 | 86.1 \pm 10.5 | 20.2 | 3732.5 \pm 489.9 | 32.1 | 2060.6 \pm 251.9 | S Me-33 | 124000 \pm 17200 |
| 11.1 | 12502.6 \pm 2812.5 | 21.1 | 1111.7 \pm 120.8 | 32.2 | 1129.8 \pm 188.1 | S Mf-33 | 72560 \pm 9300 |

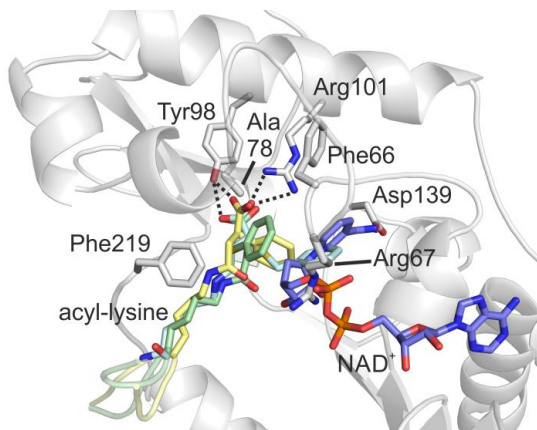


Abbildung 11 Vergleich der Bindungsmodi von **S5i-2** und **S5i-15** an einen 3-Phenylsuccinyl-Lys-Inhibitor (47) im aktiven Zentrum von Sirt5. Der zSirt5-Komplex mit **S5i-2** (Ligand in Grün) wurde mit den Komplexen mit **S5i-15** (Cyan) und mit 47 (PDB ID 4UTV; Gelb) überlagert. NAD⁺ (Hellblau) wurde aus einem Sirt5/Peptid/NAD⁺-Komplex (PDB ID 4G1C) modelliert, um die C-Bindetasche anzuzeigen. Der Proteinteil ist nur für zSirt5/2 in Klammern dargestellt (grauer Cartoon); gestrichelte Linien zeigen polare Wechselwirkungen mit der Acylgruppe an.

Um den Inhibitionsmechanismus der substituierten Benzyllderivate **S5-i16-26** genauer zu untersuchen erfolgten weitere Inhibitionsmessungen durch IC₅₀- und K_i-Wert Bestimmungen. Mit Ausnahme des o-Chlor-substituierten Benzylmercaptoderivats **S5i-16.1** führten alle Modifikationen zu IC₅₀-Werten im μM Bereich. Im Gegensatz zur Phenylmercapto-Reihe (**S5i-2-13**) war das Diastereomer (bezogen auf 3-Position des Succinylrestes) welcher später eluiert, nicht in jedem Fall die potentere Verbindung. Die IC₅₀-Werte waren für beide Isomere im Falle von **S5i-21**, **S5i-23** und **S5i-25** sehr ähnlich. Bei den 2,4,6-trimethylsubstituierten Derivaten **S5i-25.1** und **S5i-25.2** konnte anhand der IC₅₀-Werte gezeigt werden, dass das später eluierende Peptid-Derivat 8-Fach potenter war. Die Herstellung des Naphthylmethylmercapto-Derivats **S5i-35.2**, welches homolog zum Naphthyl-Derivat **S5i-34.2** war, führte zu einer Verbesserung der Inhibition mit einem IC₅₀-Wert von 15.4 ± 9.5 nM, was zu einem berechneten K_i-Wert von 7 nM führte. Eine Doppelsubstitution an Position 3 des Succinylrestes konnte zudem die inhibitorische Wirkung auf SIRT5 erhöhen. Der K_i-Wert von 3-Phenyl-3-Methyl-succinyl-CPS1 ist etwa 20-fach besser als der K_i-Wert des entsprechenden 3-Phenylsuccinyl-CPS1-Peptid-Derivats.[84] Daraufhin wurde Peptid-Derivat **S5i-36** durch Acylierung von harzgebundenem CPS1-Peptid mit 2-Methyl-2-(2-naphthylmercapto)-bernsteinsäureanhydrid synthetisiert. Für die zwei Isomere **S5i-36.1** und **S5i-36.2** konnten die IC₅₀-Werte von 60 und 90 nM (tab.5) bestimmt werden. Dementsprechend konnte die Affinität durch die 3-(2-Naphthylmercapto)succinyl-Derivate und die zusätzlichen Methylsubstitutionen am selben Kohlenstoffatom nicht verbessert werden. Um die Bedeutung der Succinylcarboxylgruppe zu untersuchen, die mit den Arginin- und Tyrosinresten im aktiven Zentrum von Sirt5 (Abb. 11) interagiert und für eine effiziente Inhibition in unteren nM Bereich sorgt, wurde die Carboxylfunktion entweder durch eine Methylgruppe oder ein Wasserstoffatom, was zu 3-(2-Naphthylmercapto)butyrylderivat **S5i-37** und 3-(2-Naphthylmercapto)propionylderivat **S5i-38** führte, ersetzt (Tab. 4). Beide Verbindungen zeigten keine Inhibition, sondern waren vielmehr Substrate für SIRT5, wie der HPLC-basierter Aktivitätstest zeigt. Um die absolute Konfiguration des besten Inhibitors zu bestimmen, wurde **S5i-33** stereokontrolliert synthetisiert (Formel 7). Das wichtigste Zwischenprodukt dieser Synthese war optisch reines 4-Methoxybenzyl-geschütztes (S)-2-(2-Naphthyl)-succinat, das aus kommerziell erhältlicher (S)-Amaleinsäure (a) hergestellt wurde (Formel 1). Zunächst wurde O-Trifluoracetyl-(S)-Äpfelsäureanhydrid (b) mit 4-Methoxybenzylalkohol umgesetzt, wodurch der entsprechende Monoester (c) entstand. [100] Die intramolekulare Cyclisierung des β-Hydroxylesters unter Mitsunobu-Bedingungen ergab (R)-β-Lacton (d), das nicht isoliert, sondern in situ mit 2-Naphthalinethiol behandelt wurde und (S)-2-(2-Naphthylmercapto)-bernsteinsäure-1-(4-Methoxybenzyl)-ester (e) ergab. [101] Die Acylierung der Säure an das harzgebundene CPS1-Peptid unter Verwendung der Standard-DIC/ HOSu-Aktivierung und die Abspaltung des Peptids vom Harz mit TFA führte zu einem einzigen Diastereomer gemäß HPLC. **Abbildung 12a** zeigt das HPLC-Chromatogramm des Reaktionsprodukts **S5i-33** unter Verwendung der Michael-Additionsreaktion.

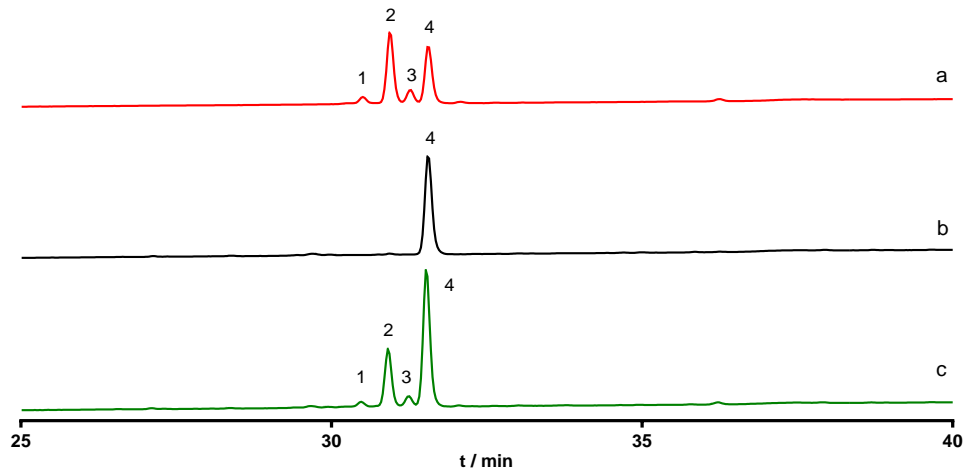
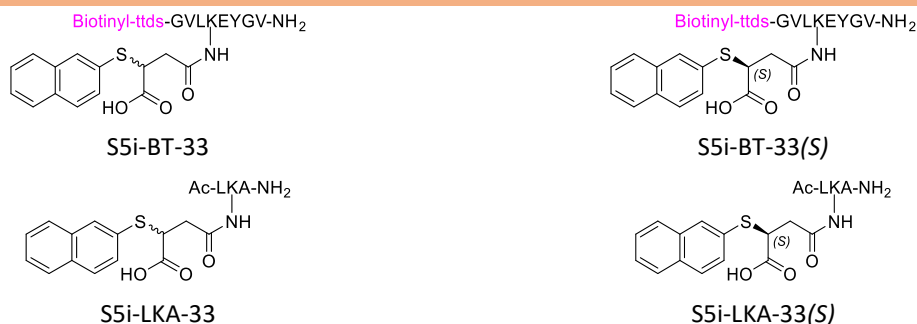


Abbildung 12: HPLC-Chromatogramme von **S5i-33**: **[A]** abgeleitet durch Michael-Addition von 2-Naphthalinthiol an Maleyl-CPS1; **[B]** **S5i-33(S)** hergestellt durch Kopplung von (*S*)-2-(2-Naphthylmercapto)-Bernsteinsäure-1-(4-Methoxybenzyl)-Ester an das CPS1-Peptid **[C]** Mischprobe, die **[A]** und **[B]** enthält.

Die Signalpeaks 1 und 3 sind die beiden 2-substituierten Succinylderivate, die beiden Hauptsignalpeaks 2 und 4 sind die 3-substituierten Arylthiosuccinylderivate **S5i-33.1** und **S5i-33.2**. Die Retentionszeit des in **Formel 7** dargestellten Reaktionsprodukts ist mit der von **S5i-33.2** vergleichbar, so dass **S5i-33.2** dem (*S*)-3-(2-Naphthylmercapto)succinylderivat zugeordnet werden kann. Darüber hinaus führte das hinzufügen des Reaktionsgemisches der Michael-Reaktion mit dem Produkt der stereokontrollierten Synthese zu einer Vergrößerung der Fläche des von **S5i-33.2** gemessenen Signals (**Ab. 12c**). Aufgrund der potenten Inhibition von Sirt5 durch **S5i-33.2** wurden die Peptid-Derivate biophysikalisch mittels *SPR* zu analysieren, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen. Nach der Analyse der Kristallstrukturen von **S5i-15** und **S5i-2** im Komplex mit zSirt5 (**Abbi.7**) zeigten sich keine Wechselwirkungen des N-terminalen Benzoylrestes mit dem Enzym.

Tabelle 6: **S5i**-Peptid-Derivate basierend auf Carbamoyl Phosphate Synthetase (CPS1) Sequenz N-terminal Biotinyliert und **S5i**-Tripeptid-Derivate LKA



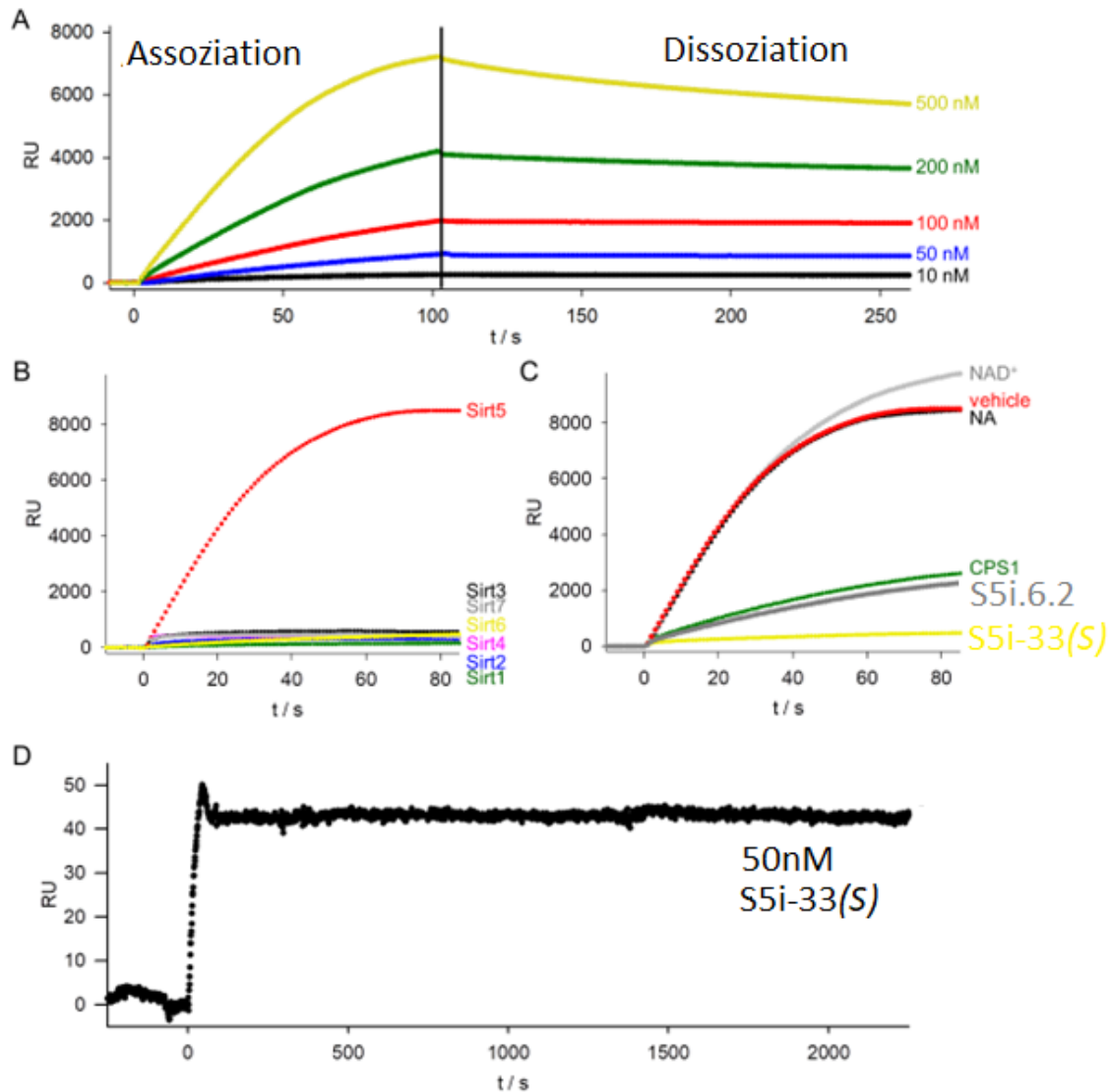


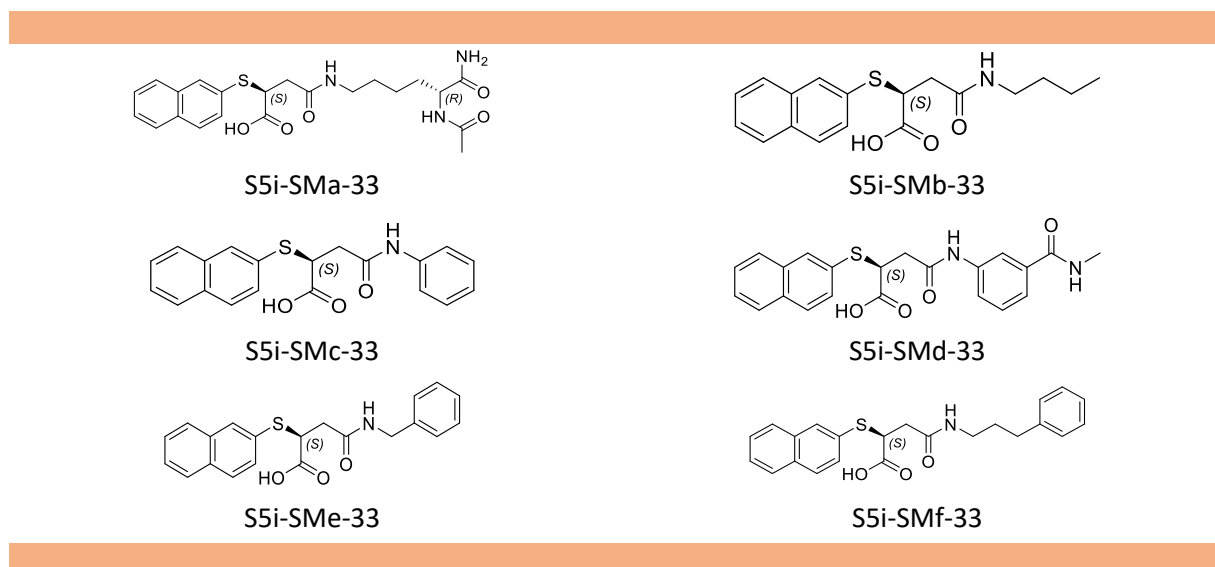
Abbildung 13: Biophysikalische Charakterisierung der Verbindungen **S5i-33.2** und **S5i-BT-39(S)** mittels SPR. **[A]** SPR-Sensorgramme, die die Bindung von SIRT5 an immobilisierte **S5i-BT-33(S)** zeigen. **[B]** Assoziationsphase der Sensorgramme, die die Bindung verschiedener Sirtuin-Isoformen (1 μ M) an immobilisierte **S5i-BT-33(S)** darstellen. **[C]** Assoziationsphase der SPR-Sensorgramme, die die Bindung von SIRT5 an den immobilisierten Inhibitor in Gegenwart eines von CPS1 abgeleiteten Peptidsubstrats mit Succinylrest an der Lysinseitenkette (2 μ M) oder der Inhibitoren **S5i-33.2** (2 μ M) und **S5i-6.2** (2 μ M) darstellen, das Vehikel ist PBS-Puffer. **[D]** Bindung von **S5i-33.2** an immobilisiertes, biotinyliertes Sirt5. Die regioselective Biotinylierung des N-Terminus von Sirt5 wurde mittels Trypsilignase-Reaktion17 durchgeführt (Abbildung S107). [93]

Nachfolgend wurde die Benzoylgruppe in **S5i-33** durch ein *Spacer*-Molekül und einen Biotinylrest (**S5i-BT-33**) ersetzt, was die Immobilisierung auf Streptavidin-beschichteten Oberflächen ermöglichte (Tab. 6). Eine Mischung aus 3-substituierten Diastereomeren (Peptid-Derivat **S5i-BT-33**), die durch Michael-Addition hergestellt wurde, zeigte einen K_i -Wert von 83.2 ± 15.4 nM, aber das Stereoisomer **S5i-BT-33(S)**, welches nach der in Formel 7 dargestellten Methode synthetisiert wurde, ist ein potenterer SIRT5-Inhibitor mit einem K_i -Wert von 13.6 ± 3.8 nM. Die Inhibition war in beiden Fällen kompetitiv gegenüber dem Peptidsubstrat (Abb. S17).

Für weitere Analysen wurden markierungsfreie SPR-Messungen in Echtzeit durchgeführt, um die Wechselwirkung zwischen dem oberflächengebundenen Inhibitor und humanem SIRT5 zu

untersuchen (Abb. 13). Das biotinylierte Peptid-Derivat **S5i-BT-33(S)**, wurde auf einem mit Streptavidin beschichteten SPR-Sensorchip immobilisiert. SIRT5 bindet am immobilisierten **S5i-BT-33(S)**, in dosisabhängiger Weise (Abb. 13a). Die Ratenkonstanten $k_{on} = (1.3 \pm 1.0) \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{off} = (1.5 \pm 0.6) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ergab einen K_D -Wert von etwa 0.12 nM. Die Bindung war bis zu 100 nM linear, was den Bewertungsbereich für die Geschwindigkeitskonstanten darstellt ($R^2 = 0.9971$; (Abb. S102)). Diese Interaktion scheint sehr spezifisch für SIRT5 zu sein, da alle anderen SIRTUIN-Isoformen vernachlässigbare K_D -Werte aufwiesen (Abb. 13b). Die höhere Affinität von **S5i-BT-33(S)** für das aktive Zentrum von SIRT5 im SPR-Experiment im Vergleich zu den kinetischen Messungen könnte durch die Immobilisierung des Inhibitors erklärt werden, die zu einem Aviditätseffekt führt. In Gegenwart des nicht-biotinylierten Inhibitors **S5i-33(S)** war SIRT5 jedoch nicht in der Lage, an Oberflächengebundenes **S5i-BT-33(S)** zu binden (Abb. 13c), was auf den erwarteten kompetitiven Peptid-Substrat-Bindungsmodus hindeutet. Dementsprechend wurde eine reduzierte, aber nachweisbare Bindung in Gegenwart von **S5i-BT-6.2**, einem Inhibitor mit einem K_i -Wert von 714 nM, oder in Gegenwart von succinyliertem CPS1-Substrat-Peptid beobachtet, was zeigt, dass Oberflächengebundenes **S5i-BT-33(S)** mit dem Substrat-Peptid konkurriert. Die Analyse der Interaktionsdetails von **S5i-33.2** mit SIRT5 durch Lösung einer zSirt5/**S5i-33.2**-Kristallstruktur (Abb. S115, Tab. S7) ergab einen unerwartenden Bindungsmodus. Obwohl er auf m- und p-modifiziertem **S5i-2** basierte, besetzte der Substituent von **S5i-33.2** die C-Bindetasche. Sein aromatisches System füllte einen Großteil der Tasche aus und blieb dennoch flexibel, wie die fragmentierte Elektronendichte und höhere B-Faktoren zeigten. Weitere Modifikationen, die sich polare Gruppen zunutze machen, könnten einen Weg für eine noch stärkere Wirksamkeit darstellen. Wie z. B. eine Addition an Position 8 der Naphthyleinheit für eine vorteilhafte Wechselwirkung mit Asp₁₃₉ (Abb. 7). Dennoch zeigen die generierten Daten, dass die Kombination einer Succinyl-Modifikation für die SIRT5-Selektivität und einer 3-(2-Naphthyl)-Succinyl-Modifikation für die Wirksamkeit zu Verbindungen führt, die SIRT5 stark und spezifisch binden.

Tabelle 7: S5i Niedermolekulare-Derivate



Der Versuch wurde *verse in versa* durch regioselektive Immobilisierung von biotinyliertem SIRT5 auf einem mit Streptavidin beschichteten Sensorchip durchgeführt. Sirt5 wurde am N-Terminus durch die Trypsiligase-Methode biotinyliert.[93]

Zu diesem Zweck wurde SIRT5 mit einem StreptII-tag und einem Tyr-Arg-His-Tripeptid am N-Terminus rekombinant verlängert. Dadurch wurde eine Erkennungssequenz für Trypsiligase eingeführt, die die Tyr-Arg-Bindung spaltet und ein Biotinyl-Gly auf den Arg-Rest überträgt, was zu einer SIRT5-Variante mit Biotinyl-Gly-Arg-His am N-Terminus führt (Abb. S107d). Biotinyliertes SIRT5 zeigte eine ähnliche enzymatische Aktivität wie das Enzym ohne Modifikation (Abb. S108b). Die Messung des immobilisierten SIRT5 mit **S5i-33.2** zeigte eine sehr schnelle Assoziation und kaum nachweisbare Dissoziation (Abb. 13d), was zu einem geschätzten K_D -Wert von etwa 10 pM führte. Es war nicht möglich, den gebundenen Inhibitor durch ausgiebiges Waschen des Sensorchips, auch über mehrere Tage, zu entfernen. Um die Eignung von dem Peptid-Derivat **S5i-BT-33(S)** für *Pull-Down*-Experimente mit komplexeren biologischen Proben zu testen, wurde **S5i-BT-33(S)** auf Streptavidin-beschichteten Agarose-Perlen immobilisiert. Diese Perlen wurden anschließend mit einem Lysat von *E. coli* BL21 (DE3) Zellen beladen, welche für die Biosynthese von SIRT5 und IPTG induziert wurden. Bei der SDS-PAGE-Analyse wurde im Durchfluss kein SIRT5 nachgewiesen. Ausgiebige Waschvorgänge entfernten viele verschiedene Proteine, aber nicht SIRT5 (Abb. 14a). Praktisch reines SIRT5 konnte mit 200 mM Natriumhydroxid eluiert werden. Die ESI-MS-Analyse dieser Elutionsfraktion ergab ein Protein mit einer Molekularmasse von 30,798 Da (Abb. 14b), was der berechneten Masse von SIRT5 von 30,796 Da entspricht. Lysate von *E. coli*, die entweder SIRT2 oder SIRT3 exprimieren, wurden für ähnliche Pull-Down-Experimente verwendet. Für diese beiden Sirtuine war kein **S5i-BT-33(S)**-Capture nachweisbar, wie die leeren Elutionsfraktionsspuren zeigen (Abb. S106a und b). Zusätzlich wurde eine äquimolare Mischung von SIRT2, SIRT3 und SIRT5 auf die Inhibitormatrix aufgetragen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. S106c). SIRT2 und SIRT3 wurden ausschließlich in den *Flow-Through*- und Waschfraktionen nachgewiesen. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden mittels ESI-MS analysiert, und das eluierte Protein wurde eindeutig als SIRT5 identifiziert (Abb. S106d).

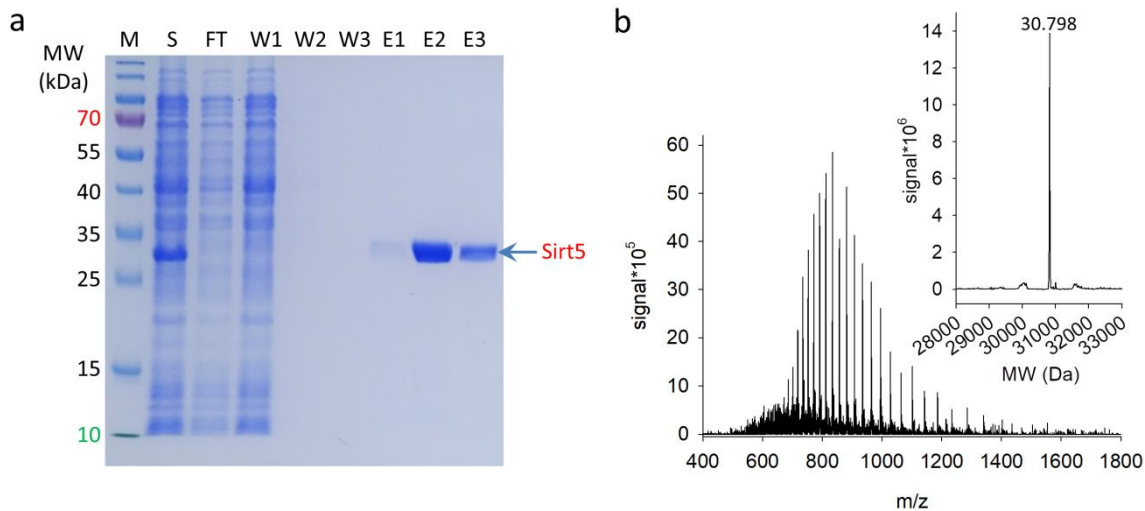


Abbildung 14: Immobilisiertes **S5i-BT-33(S)** fängt SIRT5 aus *E. coli*-Lysat ab. **[a]** SDS-PAGE-Analyse (Coomassie-Färbung) von **S5i-BT-33(S)**, gebunden an Streptavidin-beschichtete Agarose, die mit *E. coli* BL21 (DE3) Lysat interagiert, das SIRT5 exprimiert. Ausschließlich SIRT5 wurde durch Zugabe von 200 mM NaOH aus der Matrix eluiert. **Abkürzungen:** **S**, Überstand nach Zellaufschluss; **FT**, Durchfluss; **W**, Waschfraktionen; **E**, Elutionsfraktionen. **[b]** ESI-MS-Analyse der Elutionsfraktion E2; M_{calc} = 30.796 Da, M_{found} = 30.798 Da.

3.2 Peptid-Derivate mit inhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT2

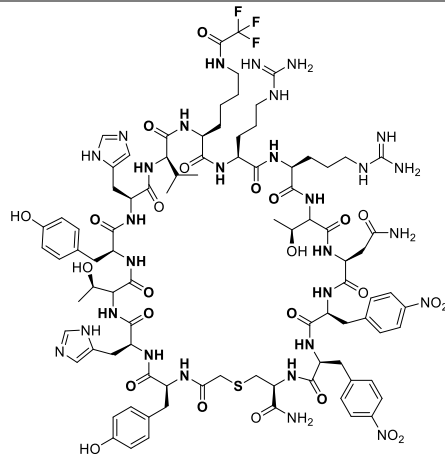
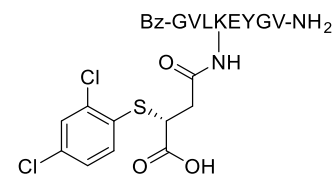
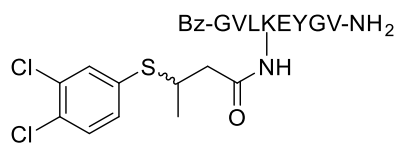
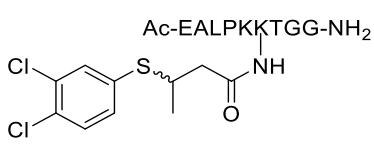
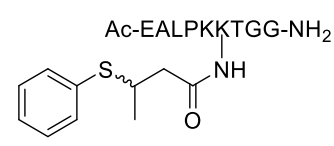
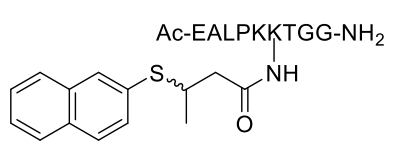
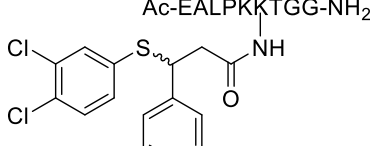
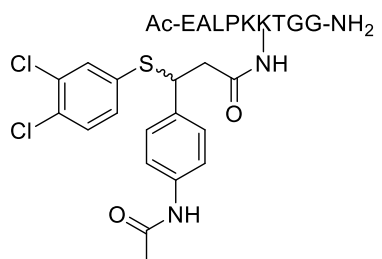
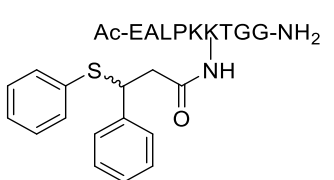
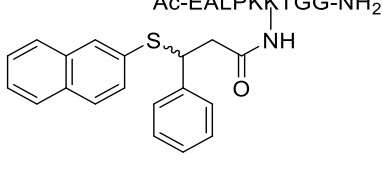
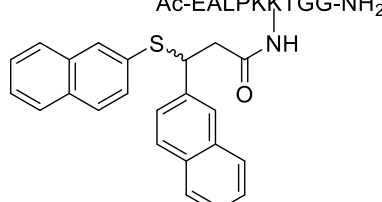
Alle Ergebnisse in diesem Abschnitt der Arbeit wurden in Kalbas et al. 2022 veröffentlicht

Im Zuge der erwähnten Arbeiten unter Verwendung der Peptid-Derivate mit inhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT5, wurde festgestellt, dass **S5i-37** zwar gegen SIRT5 keine Inhibition zeigte, jedoch gegen SIRT2. Durch den Austausch der Carboxy-Gruppe durch eine Methylgruppe ergaben sich Löslichkeitsprobleme mit der CPS1-Sequenz. Daraufhin wechselten wir zur hydrophileren TNF α -Sequenz und es wurden erneut mehrere Peptid-Derivate gegen SIRT2 mittels verschiedener Methoden vermessen.

Für die Synthese der Peptid-Derivate wurde ebenfalls die Fmoc-basierte Festphasenpeptidchemie verwendet. Nosyl-geschützte Lysin-Bausteine ermöglichten eine selektive Modifikation der jeweiligen Lysin-Seitenkette auf dem Harz, wie es schon bei den **S5i**-Derivaten durchgeführt wurde. [97] Alle Peptid-Derivate konnten mit einer Reinheit von >95 %, hergestellt werden, was mittels HPLC und einer Detektion bei 220 nm kontrolliert wurde. Alle Peptid-Derivate wiesen die erwarteten Molekulargewichte auf (Abb. S148 bis S159) und alle butyroylierten Derivate wurden als Gemisch von Stereoisomeren bezüglich der 3-Position (β -Kohlenstoffs) des Acylrests synthetisiert (Formel 5). Die Synthese begann durch Behandlung von β -Butyrolacton mit dem entsprechenden Mercaptan in Gegenwart von DIPEA in DMF. Die resultierenden Buttersäurederivate wurden durch HBTU/DIPEA aktiviert und an harzgebundene Peptid-Derivate gekoppelt, die eine ungeschützte Lysinseitenkette enthielten. im Gegensatz zu den ähnlichen 3-(Aryl(alkyl)mercapto)succinylierten SIRT5-Inhibitoren [102] war es nicht möglich, die entsprechenden 3-(Aryl(alkyl)mercapto)-butyroylierten Diastereoisomere mittels RP-HPLC zu trennen. Zur Synthese der stereochemisch definierten Verbindung **S2i-1** wurde (*R*)- β -Butyrolacton durch Behandlung mit Tosylchlorid in Pyridin bei 0°C erzeugt (Methode 2.2.9). [103] Die anschließende Öffnung des Lactonrings durch nukleophilen Angriff von 3,4-Dichlorthiophenolat ergab (*S*)-3-(3,4-Dichlorphenyl-mercapto)buttersäure, die für die Acylierung von harzgebundenen Peptid-Derivaten ähnlich wie bei der Synthese der anderen Verbindungen verwendet wurde. 3-(Aryl(alkyl)mercapto)Fettsäuren wurden ausgehend von den jeweiligen trans- β -ungesättigten Säuren synthetisiert (beispielhaft dargestellt für trans-2-Nonenoinensäure in Methode 2.2.8) Zunächst wurde der aktive Hexafluorisopropylester hergestellt und anschließend das entsprechende Thiolat an die Doppelbindung addiert, wodurch der jeweilige 3-substituierte Fettsäureester entstand. Dieser aktive Ester konnte direkt für die Acylierung von harzgebundenen Peptid-Derivaten in Gegenwart einer tertiären Base wie DIPEA verwendet werden (Methode 2.2.8). Die Stabilität aller Peptid-Derivate in dem für die enzymatischen Messungen verwendeten Puffer wurden überprüft. Die Verbindungen wurden in SIRT-Puffer gelöst, 24 h lang bei 37 °C gelagert und mittels analytischer HPLC analysiert. Alle Verbindungen zeigten keine nachweisbaren zusätzlichen Signale, was auf eine gute Stabilität hindeutete.

Ausgehend von selektiven SIRT5-Inhibitoren wurde der Einfluss freier Carboxylatgruppen und deren Modifikation auf die Selektivität und Potenz analysiert. Die Acylierung von Lysinresten mit (*S*)-3-(2-Aryl-Mercapto)-Succinyl-Resten führte zu peptidischen SIRT2-Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich (**S5i 9.1**) [102]

Tabelle 8: Strukturen der **S2i**-Peptid-Derivate und ihre inhibitorische Wirkung gegen SIRT2 zusammen mit dem Referenz-SIRT2-Inhibitor **S2iL5**. Die inhibitorische Wirkungen sind als IC_{50} (Schwarz) und K_i -Werte (Hellblau) mit MTPR-Fluoreszenzassay angegeben (* - K_i berechnet über Cheng-Prusoff-Gleichung)

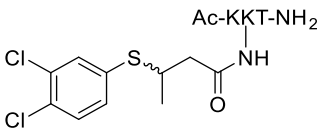
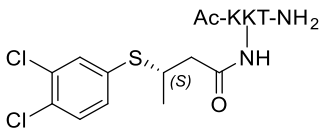
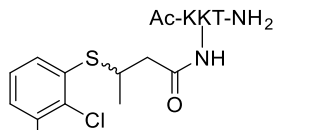
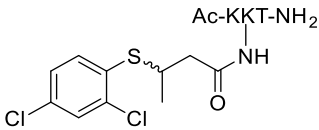
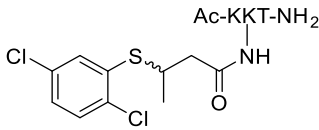
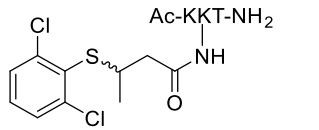
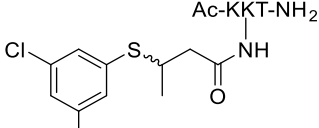
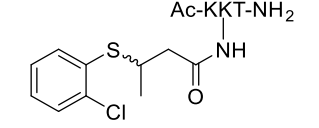
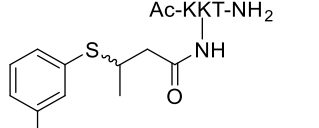
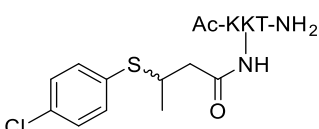
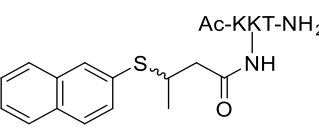
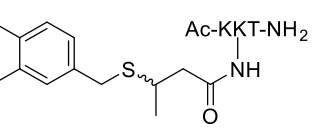
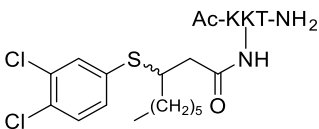
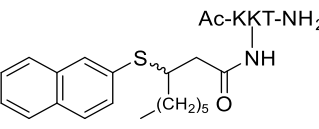
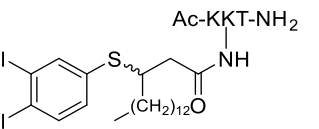
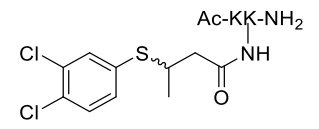
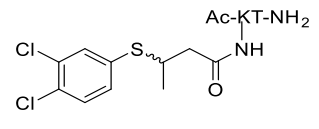
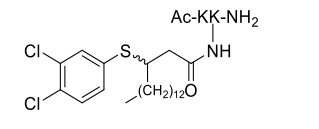
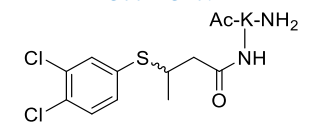
| IC_{50} (nM)+ K_i gegen Peptide (nM) | | |
|---|---|--|
|  <p>S2iL5 42.1 ± 7.9 10.5^*</p> |  <p>S5i 9.1 keine Inhibition</p> | |
|  <p>S5i-8 Löslichkeitsprobleme 28.0 ± 2.3</p> |  <p>S2i-a 201.2 ± 23.9 65.9 ± 20.6</p> |  <p>S2i-b 2206 ± 475.1 551.5^*</p> |
|  <p>S2i-c 405.3 ± 70.1 216.6 ± 17.4</p> |  <p>S2i-d 213.8 ± 18.2 53.4^*</p> |  <p>S2i-e > 10000 $> 2500^*$</p> |
|  <p>S2i-f 5570 ± 381.8 1393^*</p> |  <p>S2i-g 1330 ± 128.5 332.5^*</p> |  <p>S2i-h > 10000 $> 2500^*$</p> |

Der Austausch der Carboxylfunktion durch ein Wasserstoff (was zu 3-(Aryl-Mercapto)-Propionyl-Derivaten führte) ergab Substrate sowohl für SIRT5 [102] als auch für SIRT2. Anders verhielt es sich, wenn die Carboxylfunktion in **S5i 9.1** durch eine Methylgruppe ersetzt wurde. Das resultierende 3-(Aryl-Mercapto)butyryl-Derivat **S5i-8** war kein wirksamer SIRT5-Inhibitor mehr (IC_{50} -Wert über 300 μ M), aber ein hochwirksamer Inhibitor für SIRT2 mit einem IC_{50} -Wert von 28 ± 2.3 nM, welcher anhand eines kontinuierlichen Aktivitätstest mit dem 11-(2-Aminobenzoyl)-amino-undecanoylierten Peptidsubstrat bestimmt wurde. [89] Unglücklicherweise waren die hydrophoberen peptischen SIRT2-Inhibitoren, die von der CPS1-Sequenz mit der allgemeinen Formel Bz-GVLK(X)EYGV-Amid (X= 3-(Aryl-Mercapto)Butyryl-Rest an der Lysin-Seitenkette) abgeleitet waren, in wässrigen Puffern nur schwer löslich. Daher wurden die 3-(Aryl-Mercapto)-Moleküle unter Verwendung der besser löslichen TNF α -abgeleiteten Peptidsequenz Ac-EALPKK(X)TGG-Amid analysiert (X = 3-(Aryl-Mercapto)Butyrylrest an der Lysin-Seitenkette) (**Tab. 8**, Verbindungen **S2i-a-h**) und der Benzylrest am N-Terminus durch einen weniger hydrophoben Acetylrest ersetzt.

Der IC_{50} -Wert der von TNF α abgeleitete Verbindung **S2i-a** für SIRT2 betrug 201.2 ± 23.9 nM. Die Entfernung der beiden Chloratome (**S2i-b**) führte zu einem etwa 10-fach verschlechterten IC_{50} -Wert. Interessanterweise wurde der Ersatz der Methylgruppe des substituierten Butyrylrestes durch einen Phenylring (**S2i-d**) von SIRT2 gut toleriert. Auch hier führte die Entfernung der beiden Chloratome (**S2i-f**) zu einem Verlust der Affinität (**Tab. 8**). Der Ersatz des Phenylmercapto-Restes in **S2i-f** durch den 2-Naphthylmercapto-Rest (**S2i-g**) führte zu einem etwa 5-fach besseren IC_{50} -Wert. Die Substitution der Phenyleinheit in **S2i-g** durch einen 2-Naphthyl-Rest (**S2i-h**) führte zu einem vollständigen Inhibitionsverlust gegenüber SIRT2.

Die Verkürzung des Peptid-Derivates **S5i 9.1** führte zu einer weitaus ineffektiveren Inhibition der Enzymaktivität bei SIRT5. Die Verkürzung des Peptid-Derivates **S2i-a** zu dem Tripeptid-Derivat **S2i-1** (**Tab. 9**) zeigten dagegen ähnliche IC_{50} -Werte wie die TNF α -Derivate. Eine weitere Verkürzung entweder des C-terminalen (**S2i-KK-1**) oder des N-terminalen Teils (**S2i-KT-1**) oder beider Teile (**S2i-K-1**) führte zu einer 2.5 bis 17 Fachen schwächeren Inhibition (**Tab. 9**). Für das strukturell ähnliche Peptid-Derivat **S5i 9.1** wurde eine starke Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes für SIRT5 von der Stereochemie des 3-Kohlenstoffs der Acylgruppe beschrieben [102]. Im Gegensatz dazu wurde keine Abhängigkeit von einer ähnlichen Stereochemie gefunden, da Peptid-Derivat **S2i-1(S)** nur doppelt so aktiv ist wie **S2i-1**. Dies deutet auf einen anderen Wirkmechanismus von **S2i-1** gegen SIRT2 als gegen SIRT5 hin. Wie bei den **S5i**-Peptid-Derivaten wurden die chemischen Eigenschaften der 3-Arylmercapto-Substitution auf die IC_{50} -Werte genauer analysiert (**Tab. 9**, Peptid-Derivate **S2i-1-11**). Eine Monochlorsubstitution in der o-Position (**S2i-7**) schien keinen Effekt zu haben, wohingegen Substitutionen in der m- (**S2i-8**) oder p-Position (**S2i-9**) eine 5- bis 8-Fache potentere Inhibition im Vergleich zu **S2i-7** zeigten. Alle Dichlor-Substitutionen in der m- und/oder p-Position ergaben Inhibitoren mit IC_{50} -Werten zwischen 130 und 460 nM. Das Peptid-Derivat **S2i-5** mit beidem Chloren in o-Position zeigte den schlechtesten IC_{50} -Wert mit 4305 ± 298.1 nM. Die Einführung einer Methylengruppe in **S2i-1**, woraus das Benzylmercapto-Buttersäure-Derivat **S2i-11** resultierte, führte zu einem leicht verbesserten IC_{50} -Wert. Darüber hinaus führte der Ersatz des Dichlor-substituierten Phenylrings in **S2i-1** durch die 2-Naphthyleinheit (**S2i-10**) zu einem Tripeptid-Derivat mit einem IC_{50} -Wert von 150 ± 12.2 nM (**Tab. 9**). Die Substitution der Methylgruppe in der Acylkette von **S2i-1** durch einen Hexylrest (**S2i-12**) führte zu einem IC_{50} -Wert von 1397 ± 100.2 μ M und die Substitution durch einen Tridecanylrest (**S2i-14**) führte zu verbessertem IC_{50} -Wert von 178.2 ± 26.0 μ M. Die C-terminale Verkürzung von **S2i-14** zu dem Dipeptid-Derivat **S2i-KK-14** führte zu einer dreifach schlechteren Affinität zu SIRT2.

Tabelle 9: Strukturen der Tri- und Di-Peptid-derivate und des Lysin-Derivats **S2i-K-1** sowie IC₅₀ (Schwarz) und K_i-Werte (Hellblau). Gemessen mittels MTPR-Fluoreszenzassay (* - K_i berechnet über Cheng-Prusoff-Gleichung)

| IC ₅₀ (nM) + K _i gegen Peptid (nM) | | |
|---|---|---|
|  |  |  |
| S2i-1 452.7 ± 38.9 178.9 ± 44.1 | S2i-1(S) 211.3 ± 20.9 108.9 ± 29.4 | S2i-2 294.5 ± 26.6 73.6* |
|  |  |  |
| S2i-3 291.1 ± 18.7 73.0* | S2i-4 1173 ± 127.6 293.3* | S2i-5 4305 ± 298.1 1076* |
|  |  |  |
| S2i-6 129.2 ± 10.1 106.5 ± 26.2 | S2i-7 1315 ± 207.1 328.7* | S2i-8 163.2 ± 361.4 41.0* |
|  |  |  |
| S2i-9 256.3 ± 33.0 64.0* | S2i-10 150.0 ± 12.2 62.8 ± 11.9 | S2i-11 233.2 ± 22.7 60.5 ± 15.2 |
|  |  |  |
| S2i-12 1397 ± 100.2 537.6 ± 141.8 | S2i-13 4800 ± 690 543.3 ± 203.0 | S2i-14 178.2 ± 26.0 154.3 ± 37.28 |
|  |  |  |
| S2i-KK-1 2278 ± 328.4 1377 ± 317.1 | S2i-KT-1 1266 ± 41.6 316.4* | S2i-KK-14 582.5 ± 64.9 2125 ± 260.3 |
|  | | |
| S2i-K-1 7563 ± 1108/15690 ± 2661 | | |

Anschließend wurde die Enzymkinetik der Peptid-Derivate mittels K_i -Wertbestimmungen gegen Peptid-Substrat und NAD^+ analysiert. Alle getesteten Peptid-Derivate zeigten eine kompetitive Inhibition gegen das Substrat-Peptid (Abb. S26 bis Abb. S51). **S2i-1** inhibierte SIRT2 gegenüber dem Substrat-Peptid mit einem K_i -Wert von 102.2 ± 11.2 nM und **S2i-13** ist ebenfalls kompetitiv gegen Substrat-Peptid mit einem K_i -Wert von 489.4 ± 87.0 nM. Gegen NAD^+ zeigten **S2i-1** und **S2i-13** (Tab. S1, Abb. 15) unterschiedliche Inhibitionstypen, was auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen hinwies. Während **S2i-13** für NAD^+ kompetitiv war ($K_i = 1332 \pm 535.1$ nM), zeigte **S2i-1** eine partielle nicht-kompetitive Hemmung mit einem K_i -Wert von 2235 ± 141.5 nM für den EI Komplex und einen K_i' -Wert von 3175 ± 141.5 nM für den ESI Komplex. Darüber hinaus war **S2i-1** selektiv für SIRT2, da SIRT6 und SIRT3 10- bzw. 30-fach reduzierte IC_{50} -Werte aufwiesen und SIRT5 bis zu $300 \mu M$ von **S2i-1** nicht inhibiert wurde (Abb. S24). Die strukturell verwandten Peptid-Derivate **S2i-10** und **S2i-11** inhibierten SIRT2 ebenfalls partiell und nicht-kompetitiv gegen NAD^+ (Abb. S34 und S36) (Tab. S1). Zusätzlich wurden **S2i-6** und **S2i-12** bis **S2i-14** aus Tabelle 9 sowie **S2i-BT-1**, **S2i-CF-1** und **S2i-CF-14** aus Tabelle 10 hinsichtlich der Art der Inhibition gegenüber NAD^+ analysiert (Abb. S32, S38, S40, S42, S47, S49, S51) (Tab. S1). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 3-(Aryl/Alkyl-Mercapto)-butyroilylierten Derivate in Bezug auf NAD^+ partiell und nicht-kompetitiv sind, was auf einen sehr ähnlichen Bindungsmodus wie gegen das Substrat-Peptid hindeutet. Im Gegensatz dazu sind die 3-(Aryl/Alkyl-Mercapto)-nonaylierten und palmitoylierten Peptid-Derivate **S2i-12**, **S2i-13**, **S2i-14**, **S2i-CF-12** und **S2i-CF-13** kompetitiv gegenüber NAD^+ , was auf eine Änderung des Bindungsmodus für Derivate mit einer 3-substituierten, langen und fettacylierten Lysinseitenkette hindeutet.

Wie der nicht-kompetitive Bindungsmodus zeigte, ist der Komplex zwischen **S2i-1** und SIRT2 immer noch in der Lage, NAD^+ zu binden. Wenn Sirtuin/Inhibitor-Komplexe noch in der Lage sind, NAD^+ zu binden, gibt es mindestens zwei Möglichkeiten. Entweder bindet das NAD^+ in der jeweiligen Bindungstasche und es findet keine Katalyse statt, oder es sind erste Katalyseschritte möglich, die zur Bildung komplexerer Strukturen durch Fusion des Substrats mit Fragmenten des Co-Substrats führen, wie es für Thioamid- [104] oder Thiourea-Warheads beschrieben wurde. [105, 106] Ein Indiz für diese blockierten Intermediate sind Zeitabhängigkeiten der Inhibition, die mit Unterschieden in den ermittelten IC_{50} - oder K_i -Werten einhergehen, je nachdem, mit welchem Reagenz die enzymatische Reaktion gestartet wird. So wurden für Thioamid-basierte Sirtuin-Inhibitoren viel bessere Inhibitorpotenzen gefunden, wenn die Thioamid-haltige Verbindung mit Sirtuin in Gegenwart von NAD^+ vorinkubiert wurde, was die Bildung der blockierten Zwischenprodukte ermöglichte, bevor die enzymatische Reaktion mit dem peptidischen Substrat gestartet wurde. So wurden die Auswirkungen sowohl der Zeitabhängigkeit als auch der Reihenfolge der Zugabe auf die Inhibition von SIRT2 durch **S2i-1** getestet. Dabei konnte kein Einfluss des Reaktionsbeginns oder der Zeit auf den IC_{50} -Wert (Abb. S20) festgestellt werden. Daher konnte angenommen werden, dass **S2i-1** an das aktive Zentrum von SIRT2 bindet, wobei sich der Peptidteil in der Substratbindungsstelle befindet (kompetitiv zum Substrat-Peptid) (Abb. S28) und der Dichlorphenylteil nicht auf die Nikotin-Amid-Bindetasche (C-Bindetasche) zeigt, was eine zusätzliche Bindung von NAD^+ ohne die Bildung eines blockierten Zwischenprodukts ermöglicht (Abb. S29). So wäre es möglich, dass der Dichlorphenyl-Anteil von **S2i-1** an die Selektivitätstasche von SIRT2 bindet, was zu einer Umstrukturierung des aktiven Zentrums von SIRT2 führt. Eine ähnliche selektive SIRT2-Inhibition konnte für andere Selektivitäts-Taschenbinder gezeigt werden. [64, 67, 107–109] Diese Vermutung korreliert mit der hohen Spezifität der SIRT2-Inhibition von **S2i-1**. Andererseits scheint **S2i-12** einen ähnlichen Bindungsmodus wie die Verbindung **S5i 9** zu haben. **S5i 9** bindet an das aktive Zentrum von SIRT5 (Tab. 8), wobei die Dichlorphenyleinheit auf das C-Zentrum zeigt [102, 109, 110] und die Bindung von NAD^+ verhindert (kompetitiv zu NAD^+ (Abb. 15B und 15D sowie Abb. S37).

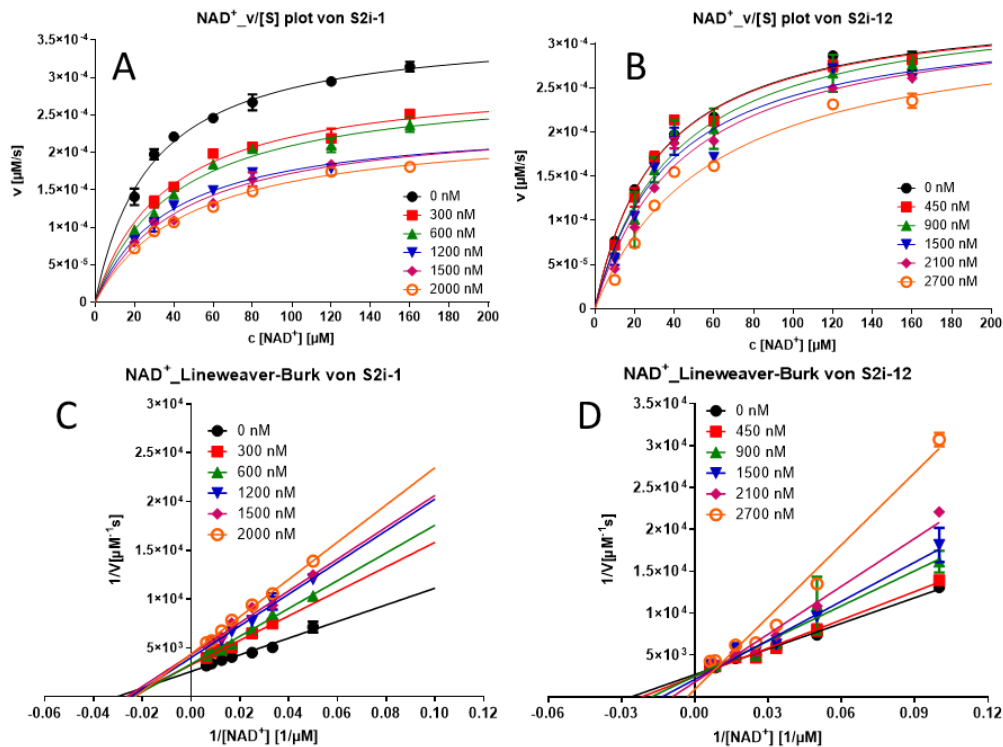
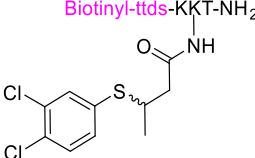
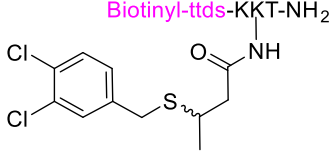
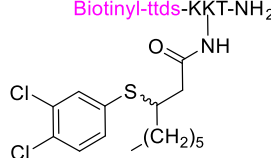
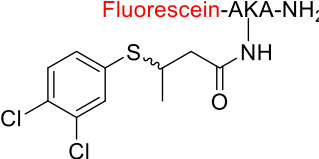
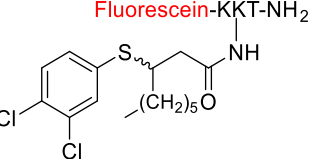
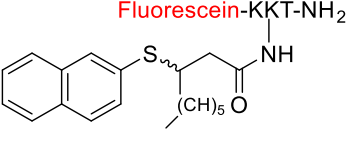


Abbildung 15: $v/[NAD^+]$ - und Lineweaver-Burk-Plots für **S2i-1** und **S2i-12**, erstellt mit SIRT2 in Gegenwart von $2 \mu\text{M}$ Substrat-Peptid. **[A]** $v/[NAD^+]$ -Plot in Ab- und Anwesenheit von **S2i-1**. **[B]** $v/[NAD^+]$ -Plot in Ab- und Anwesenheit von **S2i-12**. **[C]** Lineweaver-Burk-Diagramm der Geschwindigkeit der Deacylierung in Abhängigkeit von der Konzentration des Co-Substrats NAD^+ für die Inhibition der SIRT2-Aktivität durch **S2i-1** bei Konzentrationen zwischen 0 und $2 \mu\text{M}$. Es wird eine partielle nicht kompetitive Hemmung beobachtet. **[D]** Lineweaver-Burk-Plot der Geschwindigkeit der Deacylierung in Abhängigkeit von der Konzentration des Co-Substrats NAD^+ für die Inhibition der SIRT2-Aktivität durch **S2i-12** bei Konzentrationen zwischen 0 und $2.7 \mu\text{M}$. Es wird eine kompetitive Inhibition beobachtet. Gemessen mit MTPR-Fluoreszenz-Assay.

Um die SIRT2-Inhibitoren **S2i-1** und **S2i-12** genauer zu analysieren, wurde erneut die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie verwendet, um die Wechselwirkung zwischen Oberflächen-gebundenen Inhibitoren und SIRT2 zu untersuchen (Abb. 16). Die biotinylierten Peptid-Derivate **S2i-BT-1** und **S2i-BT-12** (Tab. 10) wurden auf Streptavidin-beschichteten SPR-Sensorchips mit dem hydrophilen Linker (ttDs) immobilisiert. Von diesen Peptid-Derivaten wurden ebenfalls die IC_{50} -Werte ermittelt (Tab. 10). **S2i-BT-1** hatte einen ähnlichen IC_{50} -Wert wie **S2i-1** und der IC_{50} -Wert von **S2i-BT-12** war im Vergleich zu **S2i-12** etwa 2.5-fach potenter.

SIRT2 bindete dosisabhängig an immobilisiertes **S2i-BT-1** (Abb. 16A). Signalintensität und Enzymkonzentration waren bis zu 100 nM linear, was in Abbildung S104 dargestellt ist. Der K_D -Wert von $22.6 \pm 6.3 \text{ nM}$ für **S2i-BT-1** konnte in Gegenwart von NAD^+ um das vierfache erhöht werden (Abb. 16B), was auf die Bildung eines ternären Komplexes zwischen **S2i-BT-1**, NAD^+ und SIRT2 hinweist. Wie auch bei **S2i-BT-33(S)** für SIRT5, wurde untersucht, ob **S2i-BT-1** für die Affinitätsreinigung von SIRT2 verwendet werden kann. Daher wurde **S2i-BT-1** auf Streptavidin-beschichteter Agarose immobilisiert und verwendeten *E.coli* BL21 (DE3) Lysat, das humanes Sirt2 exprimiert, als Input. Wie in Abbildung S110A dargestellt, wurde SIRT2 effektiv von **S2i-BT-1** gebunden und konnte in einem Schritt gereinigt werden. Eine ESI-MS-Analyse der Elutionsfraktion bestätigte die Identität von SIRT2 (Abb. S111). Um die Selektivität von **S2i-BT-1** zu testen, wurde dieselbe Säule und eine äquimolare Mischung von SIRT2, SIRT3, SIRT5 und SIRT6 (Konzentration von $20 \mu\text{M}$ für jedes SIRTUIN) als Input verwendet. Nach den Waschschrritten enthielt das Eluat ausschließlich SIRT2, wie die ESI-MS-Analyse bestätigten (Abb. S110).

Tabelle 10: Strukturen von biotinylierten (BT) und fluoreszenzmarkierten (CF) Peptid-Derivate ihre IC₅₀ (Schwarz)- und K_i-Werte (Hellblau). Gemessen mit MTPR-Fluoreszenzassay (* - K_i berechnet über die Cheng-Prusoff-Gleichung)

| IC ₅₀ (nM) + K _i gegen Peptid (nM) | | |
|--|---|---|
|  <p>S2i-BT-1 595.1 ± 71.6 274.4 ± 42.6</p> |  <p>S2i-BT-11 137.7 ± 18.5 34.5*</p> |  <p>S2i-BT-12 486.4 ± 70.60 121.6*</p> |
|  <p>S2i-CF-1 203.3 ± 24.5 116.3 ± 20.3</p> |  <p>S2i-CF-12 54.3 ± 6.1 26.8 ± 6.7</p> |  <p>S2i-CF-13 230.9 ± 8.9 70.1 ± 17.5</p> |

Eine ähnliche Abhängigkeit von NAD⁺ wurde für die Bindung von SIRT2 an das immobilisierte 3-(Benzyl-Mercapto)Buttersäurederivat **S2i-BT-11** festgestellt (K_D = 12.6 ± 1.7 nM) (Abb. S104 und Tab. S4). In Gegenwart von 500 µM NAD⁺ war der K_D-Wert etwa 12-Fach besser (K_D = 0.97 ± 0.02 nM). Interessanterweise schien die Bindung von **S2i-BT-11** wiederum sehr spezifisch für SIRT2 zu sein, denn alle anderen getesteten SIRTUINE zeigten eine vernachlässigbare Bindung an immobilisiertes **S2i-BT-11** (Abb. S104). Die höheren Affinitäten von **S2i-BT-1** und **S2i-BT-11** zum aktiven Zentrum von SIRT2 im SPR-Experiment im Vergleich zu den kinetischen Messungen (IC₅₀-Werte in Tab. 10) könnten entweder durch die Immobilisierung des Inhibitors, die zu einem Aviditätseffekt führte, oder durch das Fehlen des für die Bestimmung der IC₅₀-Werte verwendeten Substratpeptids erklärt werden.

Im Gegensatz zu **S2i-BT-1** war der K_D-Wert für **S2i-BT-12** in Gegenwart von NAD⁺ etwa dreifach höher (Abb. 16E). Dies deutete ebenfalls auf einen völlig anderen Bindungsmodus für **S2i-BT-12** als für **S2i-BT-1** hin. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit **S5i 9.1** könnte man annehmen, dass der Dichlorphenyl-Anteil von **S2i-BT-12** die C-Bindetasche in Konkurrenz zu NAD⁺ blockiert. Diese Annahme wird durch die Tatsache untermauert, dass die Bindung an immobilisiertes **S2i-BT-12** nicht spezifisch für SIRT2 ist, da es auch Auswirkungen auf SIRT3 (K_D = 3112 ± 1370 nM), SIRT4 (K_D = 48.2 ± 3.9 nM), SIRT5 (K_D = 99.6 ± 13.4 nM) und SIRT6 (K_D = 2273 ± 1221 nM) gab (Abb. 16F). Bei SIRT1 wurde keine Bindung an immobilisiertes **S2i-BT-12** detektiert.

Die langsame Dissoziation von **S2i-BT-1** (Tab. S3) und **S2i-BT-12** (Tab. S5) von SIRT2, welche anhand der kleinen k_{off}-Werte gezeigt werden konnte, führte zu einer langen Bindung der Inhibitoren, die eine Voraussetzung für eine wirksame Inhibition *in vivo* ist. [110, 111]

Um mögliche Artefakte zu vermeiden, die durch die Immobilisierung der Inhibitoren verursacht werden können, wurde die *mikroscale Thermophoresis* (MST) in Kombination mit den fluoreszenzmarkierten Peptid-Derivaten **S2i-CF-1**, **S2i-CF-12** und **S2i-CF-13** verwendet (Tab. 10). Der IC₅₀-Wert von **S2i-CF-1** war im Vergleich zu **S2i-1** etwa doppelt so hoch. Im Gegensatz dazu waren die IC₅₀-Werte der fluoreszenzmarkierten Derivate **S2i-CF-12** und **S2i-CF-13** etwa 20-Fach potenter als die der nicht markierten Gegenstücke (Tab. 10).

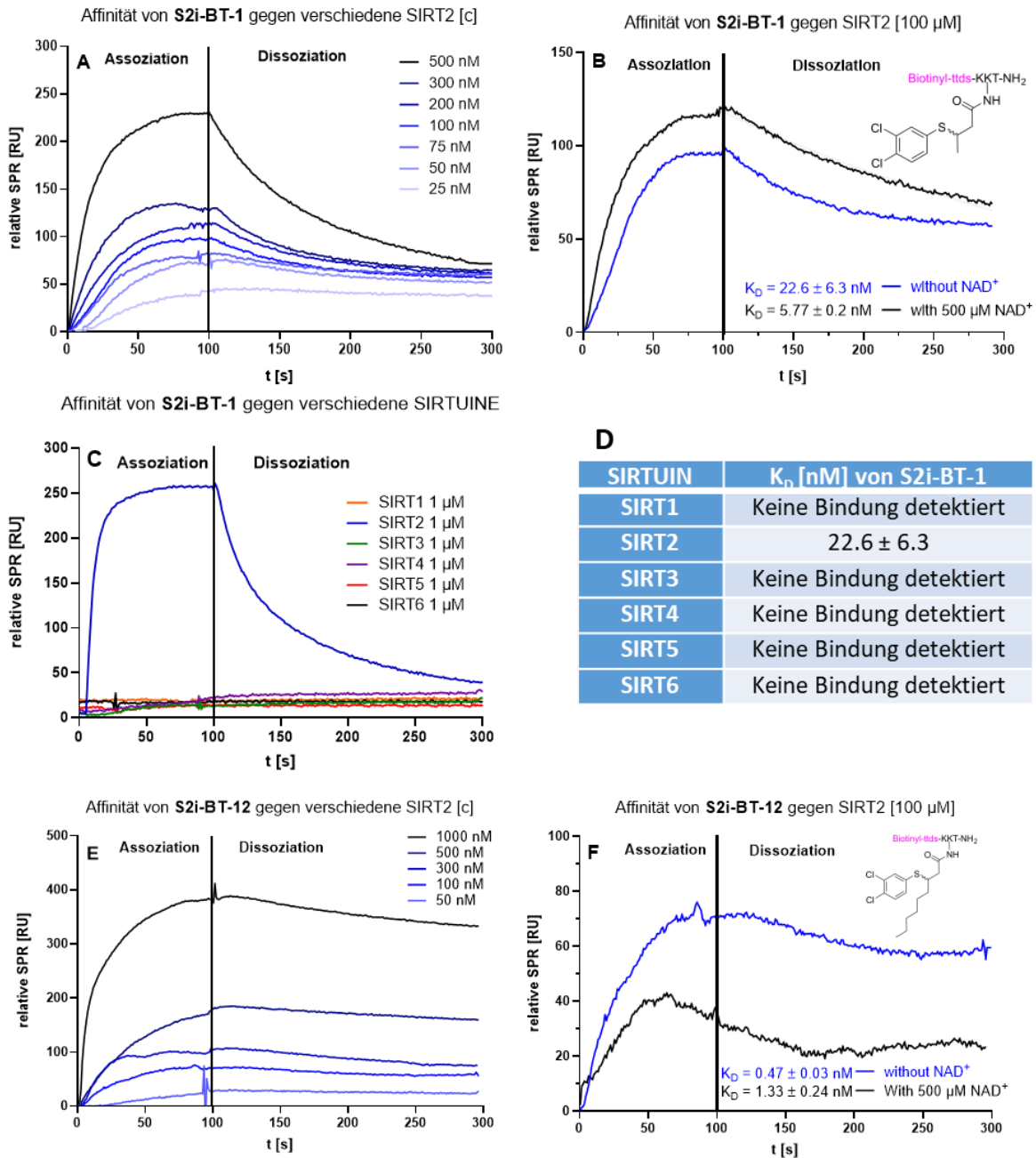
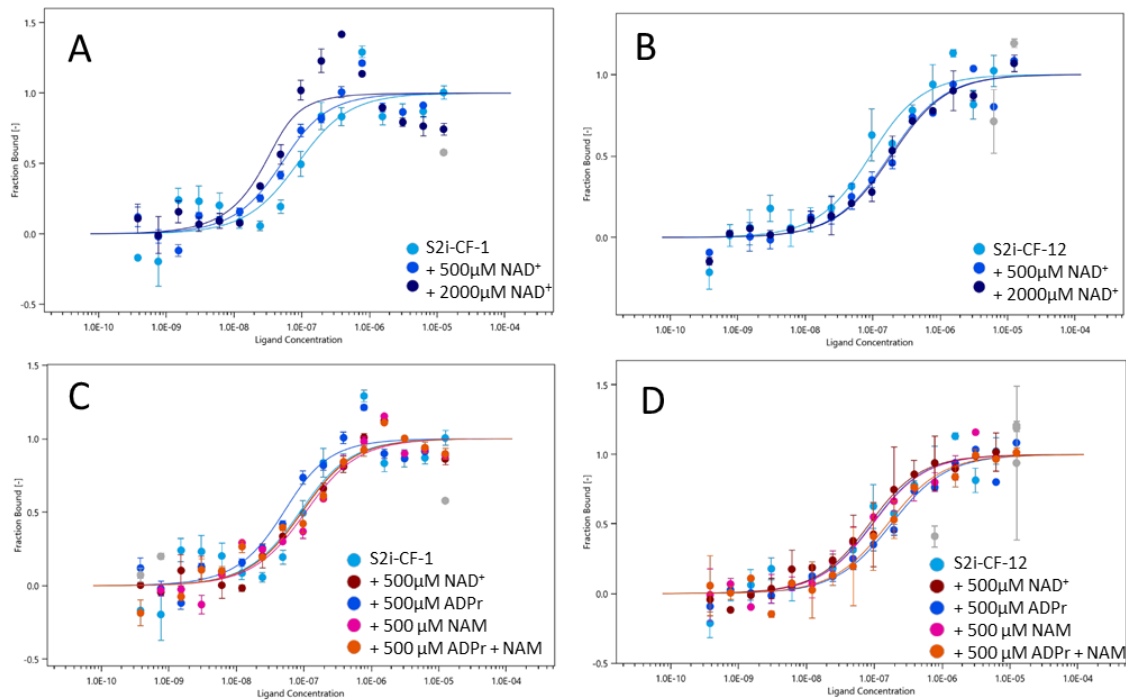


Abbildung 16: Biophysikalische Charakterisierung der Verbindungen **S2i-BT-1** und **S2i-BT-12** durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR). **[A]** SPR-Sensorgramme, die die Bindung verschiedener Konzentrationen von SIRT2 an immobilisiertes **S2i-BT-1** mit folgenden Geschwindigkeitskonstanten zeigen: $k_{on} = (3.27 \pm 0.14) \times 10^5$ M⁻¹s⁻¹ und $k_{off} = (2.76 \pm 0.09) \times 10^{-3}$ M⁻¹s⁻¹, was zu einem K_D -Wert von $22,6 \pm 6,3$ nM führt. **[B]** SPR-Sensorgramme in An- bzw. Abwesenheit von NAD⁺, was zu K_D -Werten von 5.77 ± 0.2 nM bzw. 22.6 ± 6.3 nM führt. Die Verbesserung der Bindung in Anwesenheit von NAD⁺ ist hauptsächlich auf eine erhöhte k_{on} -Rate zurückzuführen ($k_{on} = (4.62 \pm 0.05) \times 10^5$ M⁻¹s⁻¹ und $k_{off} = (2.81 \pm 0.03) \times 10^{-3}$ M⁻¹s⁻¹) (Tab. S3). **[C]** SPR-Sensorgramme, die die Bindung verschiedener Sirtuin-Isoformen (1 µM) an immobilisiertes **S2i-BT-1** darstellen **[D]** K_D -Werte, die für verschiedene SIRTUIN-Isoformen an den immobilisierten Inhibitor **S2i-BT-1** berechnet wurden. Die Bindung scheint spezifisch für SIRT2 zu sein. **[E]** Die Bindung von immobilisiertes **S2i-BT-12** in Abwesenheit von NAD⁺ führte zu folgenden Geschwindigkeitskonstanten: $k_{on} = (2.29 \pm 0.7) \times 10^5$ M⁻¹s⁻¹ und $k_{off} = (1.13 \pm 0.04) \times 10^{-4}$ M⁻¹s⁻¹, was einen K_D -Wert von 0.47 ± 0.03 nM ergibt. Im Gegensatz zu **S2i-BT-1** ist der K_D -Wert in Gegenwart von NAD⁺ etwa dreifach schlechter (Tab. S5). **[F]** SPR-Sensorgramme, die die Bindung von verschiedenen Sirtuin-Isoformen (1 µM) an immobilisiertes **S2i-BT-12** darstellen. Neben einer guten Bindung von SIRT2 konnte eine schwächere Bindung für die anderen Sirtuin-Isoformen nachgewiesen werden.



| KD [nM] | SIRT2 | SIRT2 + 500 μM NAD ⁺ | SIRT2 + 2000 μM NAD ⁺ | SIRT2 + 500 μM ADPr | SIRT2 + 500 μM NAM | SIRT2 + 500 μM ADPr + NAM |
|-----------|-------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|
| S2i-CF-1 | 67.4 ± 22.4 | 30.5 ± 14.0 | 8.71 ± 10.4 | 73.8 ± 29.0 | 86.3 ± 34.7 | 74.7 ± 28.0 |
| S2i-CF-12 | 72.5 ± 30.6 | 158 ± 39.8 | 169 ± 36.7 | 65.1 ± 16.8 | 75.2 ± 21.6 | 138.2 ± 31.4 |

Abbildung 17: Biophysikalische Charakterisierung der Verbindungen **S2i-CF-1** und **S2i-CF-12** durch Thermophorese im Mikrobereich (MST). **[A]** Berechnete Bindungskurven von **S2i-CF-1** an SIRT2 in Ab- oder Anwesenheit von entweder 500 μM oder 2 mM NAD⁺. **[B]** Berechnete Bindungskurven von **S2i-CF-12** an SIRT2 in Ab- oder Anwesenheit von entweder 500 μM oder 2 mM NAD⁺. **[C]** Berechnete Bindungskurven von **S2i-CF-1** an SIRT2 in Ab- oder Anwesenheit von entweder 500 μM NAD⁺ oder NAD⁺-Fragmenten wie ADP-Ribose (ADPr) oder einem 1:1-Gemisch aus NAM und ADPr. **[D]** Berechnete Bindungskurven von **S2i-CF-12** an SIRT2 in Ab- oder Anwesenheit von entweder 500 μM NAD⁺ oder NAD⁺-Fragmenten oder einem 1:1-Gemisch aus NAM und ADPr. Die Tabelle in der Abbildung fasst die Abhängigkeit der berechneten K_D-Werte von den verschiedenen Additiven zusammen.

Es konnte ein K_D-Wert von 67.4 ± 22.4 nM für die Bindung von **S2i-CF-1** an SIRT2 bestimmt werden (Abb. 17A). NAD⁺ verbesserte die Bindung von **S2i-CF-1** an SIRT2 um das bis zu 8-Fache (Abb. 17A). Dieser Wert lag zwischen dem ermittelten K_i-Wert für **S2i-1** und dem für **S2i-BT-1** mittels SPR ermittelten K_D-Wert. Fragmente von NAD⁺ und eine 1:1-Mischung von NAM und ADPr verbesserten die Bindung von **S2i-CF-1** an SIRT2 nicht (Abb. 17C). Im Gegensatz dazu war die Bindung von **S2i-CF-12** an SIRT2 in Gegenwart von NAD⁺ und einer 1:1-Mischung aus NAM und ADPr etwa zweifach schwächer (Abb. 17B und 17D). Das 3-(2-Naphthyl-Mercapto)-Acyl-Derivat **S2i-CF-13** zeigte ähnliche Ergebnisse wie **S2i-CF-12** mit einem etwa zweifach reduzierten K_D-Wert in Gegenwart von 2 mM NAD⁺ (K_D = 89.2 ± 8.3 nM gegenüber K_D = 202.9 ± 16.3 nM) (Abb. S78). Die mit MST bestimmten K_D-Werte waren im Allgemeinen niedriger als die kinetisch bestimmten Bindungskonstanten K_i. Daher wurde das MST-Bindungsexperiment in Gegenwart von Substrat mit einer Konzentration, die für die Bestimmung der kinetischen Konstanten verwendet wurde, wiederholt. Übereinstimmend wurde eine verringerte Bindung in Gegenwart der acetylierten TNFα-Substrate festgestellt, was zeigte, dass **S2i-CF-1** mit dem Substratpeptid konkurriert, das im Assay zur Bestimmung der kinetischen Konstanten verwendet wurde (Abb. S87c).

Eine weitere Verringerung der Bindung wurde in Gegenwart von 11-(2-Aminobenzoyl)-amino-undecanoyliertem Substratpeptid, das für die kinetischen Messungen verwendet wurde, festgestellt (Abb. S87c). Der ermittelte K_D -Wert von 144.2 ± 24.2 nM für **S2i-CF-1** lag sehr nahe an dem entsprechenden K_I -Wert von 116.3 ± 20.3 nM (Tab. 10). Zusätzlich war der K_D -Wert von **S2i-CF-1** in Gegenwart des nicht Fluoreszenzmarkierten Peptid-Derivates **S2i-1** konzentrationsabhängig reduziert (Abb. S87b), was darauf hindeutete, dass **S2i-CF-1** in ähnlicher Weise an das aktive Zentrum von SIRT2 bindet wie **S2i-1**. In Anwesenheit von SirReal2 war die Bindung von **S2i-CF-1** an SIRT2 drastisch reduziert (Abb. S87a), was darauf hindeutete, dass die 3-(Arylmercapto)-butyryl-Einheit, genau wie SirREAL2, in der *selectivity pocket* bindet.

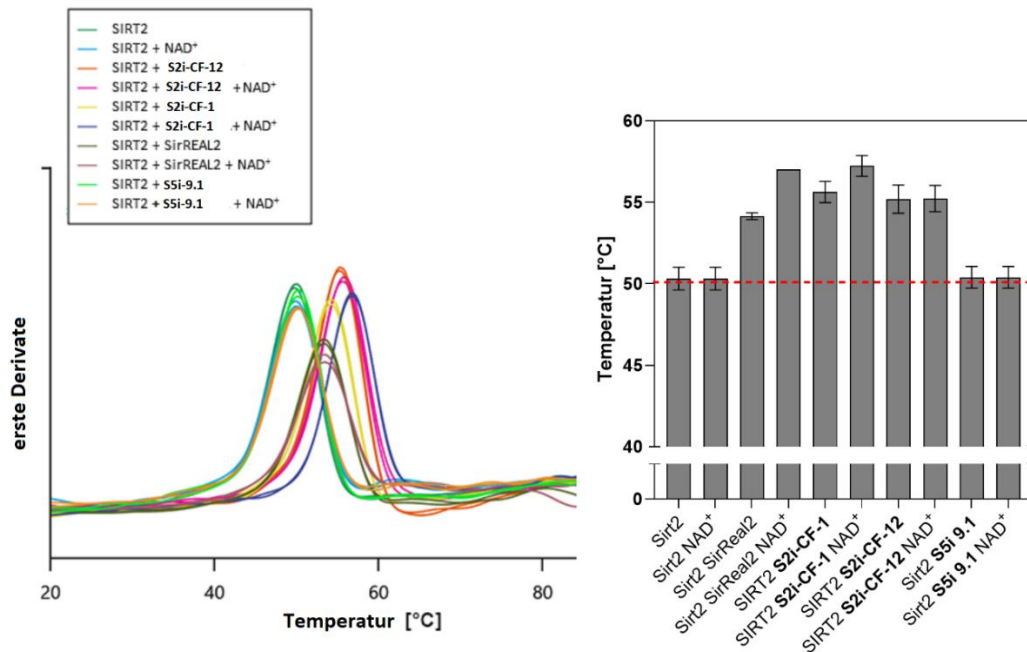


Abbildung 18: Biophysikalische Charakterisierung der Verbindungen **S2i-1**, **S2i-12**, SirReal2 und **S5i-9.1** durch *Differential-Scanning-Fluorimetrie (DSF)*. Die sich daraus ergebenden Schmelztemperaturen von SIRT2 in Gegenwart verschiedener Liganden einschließlich NAD⁺ sind in [Tabelle S7](#) aufgeführt. Die Zusammenfassung ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Experimente wurden mit dem NanoTemper Prometheus NT.48 System durchgeführt.

Da bekannt ist [63], dass die Bindung von Liganden an SIRT2 dessen Stabilität gegenüber thermischer Entfaltung erhöht, wurde die *Nano-Differential-Scanning-Fluorimetrie (nanoDSF)* verwendet [112] um den Übergang der thermischen Entfaltung von SIRT2 in Ab- und Anwesenheit von **S2i-1**, **S2i-12** und NAD⁺ zu analysieren (Abb. 18). NAD⁺ allein hatte keinen Einfluss auf die thermische Stabilität von SIRT2. Die Zugabe von **S2i-12** erhöhte die Denaturierungstemperatur (Tm) von SIRT2 um 4 °C. Die Zugabe von NAD⁺ führte nicht zu einer weiteren Tm-Verschiebung des SIRT2/**S2i-12**-Komplexes. Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe von NAD⁺ eine deutliche Auswirkung auf die thermische Stabilität des SIRT2/**S2i-1**-Komplexes, was sich in einem Anstieg der Tm um etwa 2 °C zeigte. Zu Vergleichszwecken wurde der Einfluss von SirReal2 auf die thermische Stabilität von SIRT2 untersucht. SirReal2 erhöhte die Tm von SIRT2 um 4 °C und in Gegenwart von SirReal2 und 500 μM NAD⁺ um 7 °C. Als Negativkontrolle wurde der SIRT5-Inhibitor **S5i 9.1** verwendet. Es wurden keine signifikante Änderung der Tm sowohl für **S5i 9.1** als auch für **S5i 9.1** in Kombination mit NAD⁺ gemessen. Zusammengefasst bestärken diese Daten die Hypothese von unterschiedlichen Bindungsmodi für **S2i-1** und **S2i-12**. NAD⁺ ist in der Lage, den SIRT2/**S2i-1** Komplex zu stabilisieren, nicht aber den SIRT2/**S2i-12**-Komplex. (Tab. S7) Der erwartete Unterschied in den Bindungsmodi von den Peptid-Derivaten mit Methylsubstituenten im Vergleich zu Peptid-Derivaten mit längeren Alkylketten steht im Einklang mit den *Docking*-Studien der Wechselwirkungen von **S2i-1**, **S2i-12** sowie **S2i-14** mit dem aktiven Zentrum von SIRT2.

Das Peptid-Derivate **S2i-1** beeinträchtigt die NAD⁺-Bindung nicht, während die Peptid-Derivate **S2i-12**, **S2i-13** und **S2i-14** mit ihr überlappen (Abb. 19A). Der aromatische Dichlorphenyl-Substituent von **S2i-1** befindet sich, unabhängig von der Stereochemie des Acyl- β -Kohlenstoffs, in der *selectivity pocket*, in der der selektive SIRT2-Inhibitor SirReal2 über seinen Dimethylpyrimidin-Anteil interagiert. Derselbe aromatische Substituent von **S2i-14** befindet sich in der C-Bindetasche (Abb. 19A). Die Alkylkette von **S2i-14** ist auf den hydrophoben Acylbindungskanal von SIRT2 gerichtet und zeigt eine ähnliche Bindung wie die Myristoylkette eines myristoylierten Peptids. Die konservierten Wechselwirkungen des Peptidrückgrats mit der Proteinoberfläche sind bei beiden Inhibitoren erhalten geblieben (Abb. 24). Sie gehen Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren am Eingang der Substratbindetasche (Gly₂₃₆, Glu₂₃₇ und Gln₂₆₇) ein und reproduzieren damit den Bindungsmodus des mit SIRT2 kokristallisierten myristoylierten Peptids [40]. Das acylierte Lysin befindet sich im hydrophoben Substratbindungskanal, wo die Amidgruppe mit dem Carbonyl des Rückgrats von Val₂₃₃ interagiert, und die Substratinteraktion nachahmt.

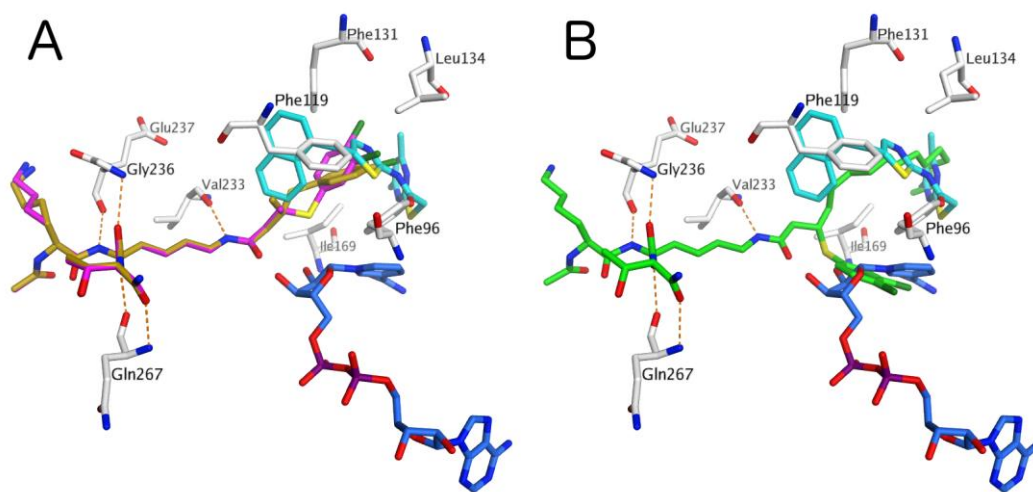


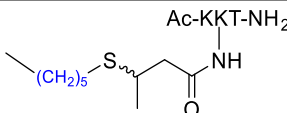
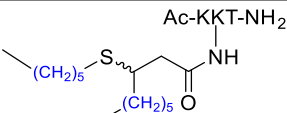
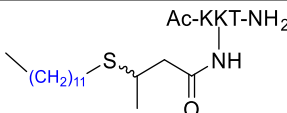
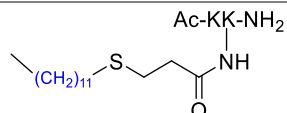
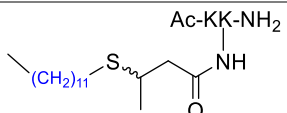
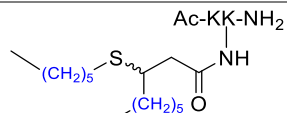
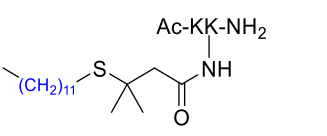
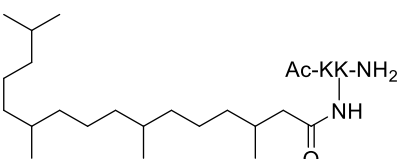
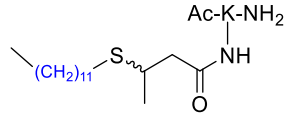
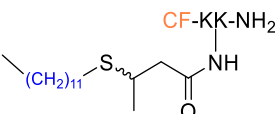
Abbildung 19: Docking-Studien der Peptid-Derivate **S2i-1** und **S2i-14** in SIRT2: **[A]** **S2i-1** (Magentafarbene/Senfgebl für die jeweiligen R/S-Isomere) und **[B]** **S2i-14** (Grün, Isomer S). Der selektive SIRT2-Inhibitor SirReal2 (Cyan) und NAD⁺ (Blau) sind zum Vergleich dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur wichtige Aminosäurereste (Weiß) dargestellt. Wasserstoffbrückenwechselwirkungen sind als gestrichelte, orange Linien dargestellt. Stickstoffatome sind Dunkelblau, Sauerstoff ist Rot, Schwefel ist Gelb, Chlor ist Dunkelgrün und Phosphor Dunkelmagenta gefärbt.

Neben den unterschiedlichen Bindungsmodi wurde untersucht, wie sich die Inhibition auf acetyliertes und myristoyliertes Substrat-Peptid auswirkt. Der Acylrest in dem verwendeten 11-(2-Aminobenzoyl)-amino-undecanoylierten Substrat-Peptid könnte als strukturell näher an der myristoylierten Lysin-Seitenkette als an der acetylierten Lysin-Seitenkette betrachtet werden. Es wurde gezeigt, dass Inhibitoren, die bei *Screening*-Tests mit acetylierten Substraten identifiziert wurden, in den meisten Fällen die SIRT2-vermittelten Demyristoylierungen nicht inhibieren konnten [65, 66]. Die daraus resultierende Frage, ob die hier beschriebenen Inhibitoren neben acetylierten auch myristoylierte Substrate inhibieren. Interessanterweise hatte **S2i-KK-14** einen sehr ähnlichen IC₅₀-Wert von 430 ± 24.5 nM, wenn es mit einem acetylierten TNF α -abgeleiteten peptidischen Substrat analysiert wurde (Abb. S22 und S71), während es myristoyliertes TNF α -Peptid bis 50 μ M gar nicht inhibierte. Gleiche Ergebnisse zeigten auch die anderen Peptid-Derivate. Während alle gegen acetyliertes Substrat im nanomolaren Bereich inhibierten, zeigten sich gegen myristoyliertes Substrat-Peptid gar keine Inhibition. Daraus kann geschlossen werden, dass das 11-(2-Aminobenzoyl)-amino-undecanoylierten Substrat Peptid, kinetisch ähnlich wie das acetylierte Substrat reagiert.

3.3 Peptid-Derivate mit pseudoinhibitorischen Eigenschaften gegen SIRT2

Um nicht nur oft beschriebene Peptid-Derivate [65, 67] synthetisiert zu haben, die nur gegen acetyliertes Substrat-Peptid inhibieren, wurde überlegt, welche Modifikationen am Lysinrest dafür geeignet wären. Die Peptid-Derivate **S2i-12** und **S2i-14** haben lange fettacylierte Modifikationen, ähnlich wie das myristoylierte Substrat-Peptid. So wurden die Seitenketten mit den Phenylringmodifikationen entfernt und die Peptide **SD-KKT-2,2a** und **2b** nach Methode 2.2.12 synthetisiert und vermessen (Tab. 11).

Tabelle 11. SD-Peptid-Derivate und IC_{50} Werte, gemessen mittel Fluoreszenzassay der Dipeptid- (KK/KT) and Lysin (K) Derivate

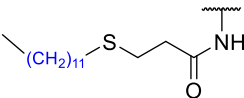
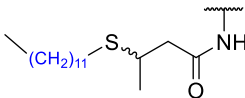
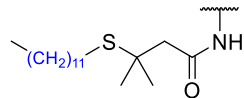
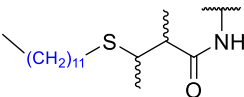
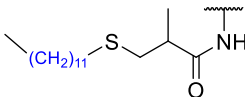
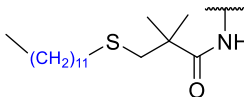
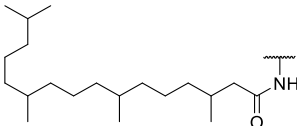
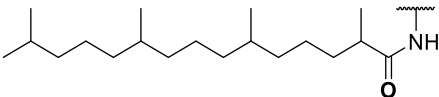
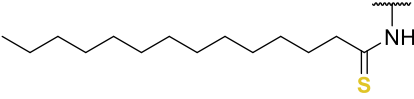
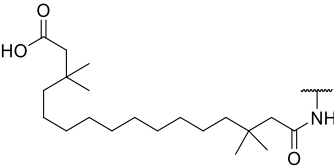
| IC_{50} (nM) | | |
|---|---|--|
|  SD-KKT-2a 276.5 ± 51.88 |  SD-KKT-2b 582.0 ± 49.98 |  SD-KKT-2 < 5 |
|  SD-KK-1 109.6 ± 20.29 |  SD-KK-2 15.40 ± 1.74 |  SD-KK-2b 2008 ± 178.1 |
|  SD-KK-3 9.77 ± 2.06 |  SD-KK-7 18.48 ± 3.45 | |
|  SD-K-2 39.51 ± 4.28 |  SD-CF-2 13.06 ± 4.16 | |

Die Tripeptide **SD-KKT-2a** ($IC_{50} = 276.5 \pm 51.88$ nM) und **SD-KKT-2b** ($IC_{50} = 582.0 \pm 49.98$ nM) zeigten im Fluoreszenzassay einen 1.5 bis 2.5-fach schlechteren IC_{50} -Wert als **S2i-14** mit 178.2 ± 26.0 nM (Tab 12) **SD-KKT-2** war inhibitorisch so potent ($IC_{50} < 5$ nM), dass es mit dem aktuellen Fluoreszenzassay nicht messbar war. Daraufhin wurden die Tripeptide **SD-KKT-2** und **SD-KKT-2b** auf die Dipeptide **SD-KK-2** und **SD-KK-2b** für eine bessere Vergleichbarkeit gekürzt, da das Peptidrückgrat mit seinen Wechselwirkungen ebenfalls Einfluss auf den IC_{50} -Wert hatte. Während sich der IC_{50} -Wert von **SD-KK-2b** um das Vierfache verschlechterte, befand sich der IC_{50} -Wert für **SD-KK-2** immer noch im unteren nanomolaren Bereich. Auch die Verkürzung auf das Lysin Derivat **SD-K-2** zeigte nur eine Verschlechterung um das Zweifache auf 39.51 ± 4.28 nM.

Einen Hexylrest in 3-Position ist demnach ungünstiger für die Bindung als eine Methylgruppe an 3-Position. Um den Einfluss der Methylgruppe an der 3-Position zu analysieren, wurden die Dipeptide **SD-KK-1** und **SD-KK-3** synthetisiert. Interessanterweise verbesserte sich der IC_{50} mit jeder zusätzlichen Methylgruppe an der 3-Position.

Phytanoylsäure, welche Menschen über die Nahrung, z.B. durch Buttermilch, aufnimmt, besitzt ebenfalls Methylierungen unter anderem auch an der 3-Position. Dadurch ist es nicht möglich das die Phytansäure durch die β -Oxidation abgebaut wird. Deswegen wird durch die α -oxidation Phytansäure zu Pristoylsäure umgewandelt, mit einer Methylierung an 2-Position, wodurch die β -Oxidation diese Fettsäure abbauen kann. [113, 114] Daher wurde die Lysinmodifikation mit Phytanoylsäure, die ebenfalls an der 3-Position methyliert ist, am Lysin mittels [Methode 2.2.14](#) synthetisiert und vermessen. Das Lysin wurde ebenfalls mit Pristanoylsäure modifiziert, voraus Peptid-Derivat **SD-8** synthetisiert wurde. Der gemessene IC_{50} -Wert von 18.48 ± 3.45 nM von **SD-7** liegt im gleichen Bereich wie die synthetisierten **SD**-Peptid-Derivate. Genau wie bei den **S2i**-Peptid-Derivaten wurde untersucht ob die **SD**-Derivate neben acetyliertes und auch gegen myristoyliertes Substrat-Peptid inhibieren. Alle Di-Peptide mit einer Methylgruppe in 3-Position hatten einen IC_{50} -Wert von < 100 nM gegen acetyliertes Substrat-Peptid und es wurde eine Inhibition gegen myristoyliertes Substrat-Peptid gemessen.

Tabelle 12: Peptid-Derivate und IC_{50} Werte, gemessen mittel Fluoreszenzassay mit dem Rückgrat Ac-EALPKK(X)Y(NO₂)GG-NH₂

| IC_{50} (nM) | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| SD-1 16.58 ± 3.62 | SD-2 < 2 | SD-3 2.54 ± 1.35 |
|  |  |  |
| SD-4.1/4.2 $4.05 \pm 0.85/1.42 \pm 0.48$ | SD-5 4.39 ± 0.90 | SD-6 2.33 ± 0.27 |
|  |  | |
| SD-7 < 2 (TNF α 33) | SD-8 4.74 ± 1.82 | |
|  |  | |
| SD-9 4.80 ± 2.86 | SD-10 5.22 ± 1.69 | |

Auch hier zeigte die potenteste Myristoyl-Inhibition das Peptid-Derivat **SD-KK-3**, mit der Dimethylierung, während **SD-KK-1** ohne Methylgruppe mit über 50 μM kaum gegen Myristoyl-Peptid inhibierte. Gemessen wurden diese Werte mit einem direkten diskontinuierlichen HPLC-Assay. Dafür wurden in den Substrat-Peptiden ein Nitrotyrosin im Peptidrückgrat eingebaut, um bei einer Wellenlänge von 340 bzw. 360 nm allein den Substrat/Produktumsatz verfolgen zu können. Die synthetisierten Lysinmodifikationen sind denen des myristoylierten Substrat sehr ähnlich, mit Ausnahme des Schwefels in der 4-Position. Aufgrund der Substrat Ähnlichkeit wurden die Substrateigenschaften der **SD**-Peptid-Derivate untersucht. Da Die Di- und Tripeptide mit einer freien Lysinseitenkette mittels HPLC nicht detektierbar waren, da diese zu früh im Injektionspeak eluieren, wurden für die Untersuchung der Substrateigenschaften mit der HPLC TNF α -Derivate synthetisiert (Tab. 12). Diese besitzen ebenfalls ein Nitrotyrosin im Rückgrat, um den Umsatz spezifisch bei 340 bzw. 360 nm verfolgen zu können. Die TNF α Peptid-Derivate **SD 1-3** und **SD-7** wurden bei 37°C für 24 h mit SIRT2 und NAD⁺ inkubiert und mittels HPLC vermessen. (Abb. S61 und S62) interessanterweise wurde **SD-1** nach 24 h vollständig umgesetzt, während mit steigender Anzahl der Methylierungen an der 3-Position die Substrateigenschaften schwächer wurden. Das Derivate **SD-7** mit der natürlich vorkommenden Phytanoylsäure zeigte nur einen geringen Umsatz von 28 % während, das Derivat **SD-8** mit dem α -oxidations Produkt Pristanoylsäure vollständig umgesetzt wurde. Die Methylierung in der 3-Position sorgt dementsprechend für eine Umsatzverschlechterung. Derivat **SD-9** wird mit 73 % nach 24 h umgesetzt (Abb. S62). **SD-9**, welches eine *Thioamid-Warhead* besitzt, geht die beschriebene kovalente Bindung mit NAD⁺ ein und bildet ein langsam umzusetzende S-Alkylamididat-Thioamid Intermediat. Daher schien **SD-9** innerhalb von 24 h genug Zeit zu haben um von SIRT2 (und SIRT3) umgesetzt werden zu können. Bei allen 24 h Tests wurde ein Entschwefelungspeak detektiert. [17] Daher ist es wichtig zu untersuchen, ob die beschriebenen Peptid-Derivate umgesetzt werden oder ebenfalls die entschwefelten Substrate. Daher wurden die Substrateigenschaften genauer charakterisiert, indem die Peptid-Derivate mittels $v/[S]$ Charakteristik untersucht wurden.

Tabelle 13: Umsatz der Peptide-Derivative nach 24 h bei 37 °C

| Peptid-Derivat | Stabilität | Umsatz von SIRT2 nach 24 h | Umsatz von SIRT3 nach 24 h |
|----------------|------------|----------------------------|----------------------------|
| SD-1 | Stabil | 100 % | 100 % |
| SD-2 | Stabil | 33 % | 94 % |
| SD-3 | Stabil | 6 % | 11 % |
| SD-4.1 | Stabil | 32 % | 87 % |
| SD-4.2 | Stabil | 13 % | 55 % |
| SD-5 | Stabil | 96 % | 100 % |
| SD-6 | Stabil | 3 % | 4 % |
| SD-7 | Stabil | 28 % | 98 % |
| SD-8 | Stabil | 100 % | 100 % |
| SD-9 | Stabil | 73 % | 77 % |
| SD-10 | Stabil | 16 % | 17 % |

Die Peptid-Derivate wurden für jede Messung frisch gelöst, und die $v/[S]$ Plots zeigten, dass alle **SD**-Peptid-Derivate einen ähnlichen K_M aufwiesen (Tab. 14 Abb. S66 bis S69), der k_{cat} jedoch wurde mit steigender Methylgruppenanzahl langsamer. Als Kontrolle wurden die Substrat-Peptid TNF α -Ac/NO₂ und TNF α -Myr/NO₂ mittels SIRT2 und Methode 2.3.1 vermessen. TNF α -Ac/NO₂ hatte einen K_M von 20.3 \pm 3.6 μM während TNF α -Myr/NO₂ eine höhere Affinität zu SIRT2 zeigte (0.63 \pm 0.07 μM). Die Peptid-Derivate **SD-1,2** und **3** (Abb. S66, S67) hatten alle einen ähnlichen K_M -Wert im unteren mikromolaren

Bereich (Tab. 14) und damit eine 6-bis 10-fache Affinität als das acetylierte Substrat-Peptid. Das erklärte auch die potenten IC_{50} -Werte, wodurch das Detektionslimit von 5 nM erreicht wurde. Betrachtet man jedoch die k_{cat} Werte, sieht man eine korrelierende Verschlechterung mit jeder weiteren Methylgruppe. Auch **SD-7** (Abb. S67) zeigte einen verringerten k_{cat} -Wert, während **SD-9** (Abb. S68) ähnliche Werte wie TNF α -Myr/NO₂ aufwies (Abb. S65).

Tabelle 14: Vergleich der kinetischen Eigenschaften. In Grün sind die Ergebnisse gegen SIRT3 aufgelistet

| Peptid-Derivat | K_M [μ M] | k_{cat} [s^{-1}] | k_{cat}/K_M [$M^{-1} s^{-1}$] |
|--------------------------------------|------------------|------------------------|-----------------------------------|
| TNF α -Ac/NO ₂ | 20.3 \pm 3.6 | 0.24 | 12000 (1.20*10 ⁴) |
| TNF α -Ac/NO ₂ S3 | 6.84 \pm 0.83 | 5.8*10 ⁻² | 8520 (8.52*10 ³) |
| TNF α -Myr/NO ₂ | 0.63 \pm 0.07 | 7.5*10 ⁻² | 123000 (1.23*10 ⁵) |
| TNF α -Myr/NO ₂ S3 | 0.59 \pm 0.09 | 7.9*10 ⁻² | 134000 (1.34*10 ⁵) |
| SD-1 | 2.6 \pm 0.6 | 6.9*10 ⁻² | 26000 (2.60*10 ⁴) |
| SD-2 | 4.5 \pm 1.3 | 2.2*10 ⁻³ | 480 |
| SD-3 | 4.2 \pm 1.2 | 8.0*10 ⁻⁴ | 192 |
| SD-7 | 1.28 \pm 0.29 | 8.92*10 ⁻³ | 6970 (6.97*10 ³) |
| SD-8 | 1.22 \pm 0.18 | 1.18*10 ⁻² | 9730 (9.73*10 ³) |
| SD-9* | 0.64 \pm 0.35 | 2.58*10 ⁻² | 40200 (4.02*10 ⁴) |

*kinetische Konstanten könnten das Ergebnis des entschwefelten Substrates sein

Vergleicht man nun die k_{cat}/K_M Werte der gemessenen SD-Derivate mit den IC_{50} -Werten gegen TNF α -Myr/NO₂ so erkennt man eine Korrelation (Abb. 20) Die Substrate werden so langsam umgesetzt, dass diese als Pseudoinhibitoren fungieren. Dies kann durch ein *Stalled-intermediate* geschehen, wie bei den Pseudoinhibitoren TM und JH-T4, beschrieben [115, 116] Daher wurde, wie bei den **S2i**-Peptid-Derivaten, die Auswirkungen der Zeitabhängigkeit einer NAD⁺ Vorinkubation auf die Inhibition von SIRT2 durch **SD**-Peptid-Derivate untersucht. Wenn die **SD**-Peptid-Derivate in einem Intermediat feststecken sollten, sollte die Vorinkubation die Inhibition verbessern. Es wurde kein Einfluss der NAD⁺ Vorinkubation (gemessen mit 15 und 30 min) auf die Inhibition gemessen, Außer bei Peptid-Derivat **SD-9**, welches als Vergleichs-Peptid dient, da dieser eine *Thiomyristoyl-Warhead*, wie TM und JH-T4, aufweist. (Abb.21). Die Pseudoinhibition erfolgt nicht durch ein *stalled intermediate*, sondern eventuell durch eine Verdrehung der Amid-Bindung durch die Methylierung and 3- und 2-Position. Die **SD**-Peptid-Derivate binden an das aktive Zentrum von SIRT2, wobei sich der Peptidteil in der Substratbindestelle befindet und die acylierte Modifikationen bei diesen Derivaten nicht auf die Nikotin-Amid-Tasche (C-Bindetasche) zeigt, sondern die Methylgruppen in der 3-Position, was eine zusätzliche Bindung von NAD⁺, ohne die Bildung eines blockierten Zwischenprodukts, ermöglicht. Die Drehung ist wahrscheinlich nicht optimal für den nukleophilen Angriff am C1 des ADP-Riboseringes vom NAD⁺. Dieser Effekt wurde auch schon in Roessler et al. (2014) beschrieben, wo eine Methylierung in 3-Position die Amid-Bindung des Lysins im aktiven Zentrum verdreht hat, jedoch durch die AS Tyr₉₈ und Arg₁₀₁ stabilisiert worden sind. [84] Es wurde vermutet, dass der Fettsäure-Anteil ebenfalls in dem Hydrophoben Tunnel Richtung Selektivitätstasche von SIRT2 bindet und trotz Verdrehung durch die hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe (96, 119, 131, 134, 169) fest binden kann, was zu einer Umstrukturierung des aktiven Zentrums von SIRT2 führt [40], ähnliche wie das Peptid-Derivat **S2i-1**. Um die Ergebnisse zu bekräftigen, das sowohl Peptid-Derivat als auch NAD⁺ binden wurde das fluoreszenzmarkierte Peptid-Derivat **SD-CF-2** synthetisiert, um Bindungen mit SIRTUINEN und NAD⁺ mittels MST zu charakterisieren

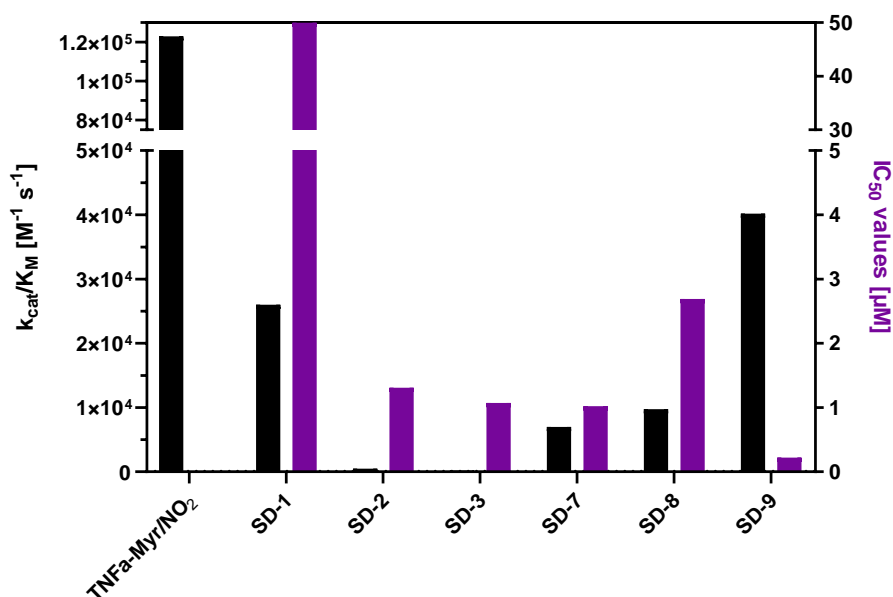
Vergleich von Substrat- und Inhibitoreigenschaften der TNF α -peptidderivate

Abbildung 20: Vergleich der Substrat- und Inhibitoreigenschaften der TNF α -Peptid-Derivate für SIRT2. Beide Experimente wurden mit einer Endpunktmessung mittels HPLC bei 360 nm detektiert. für Peptid-Derivat **SD-1** wurde keine Inhibition bis 50 μM gemessen.

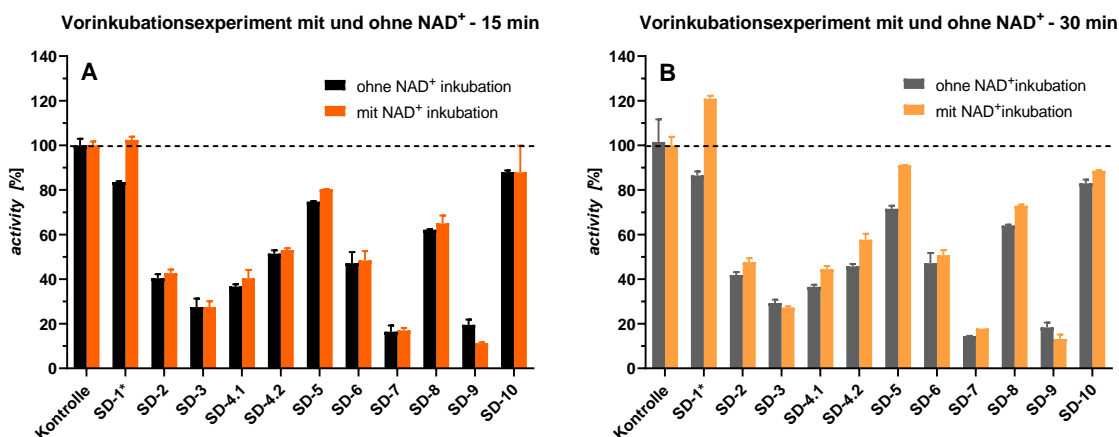


Abbildung 21 Vergleich der Inhibition mit und ohne NAD⁺-Vorinkubation. Es wurde 1 μM Peptid-Derivat und 0.1 μM SIRT2 mit und ohne 500 μM NAD⁺ für verschiedene Zeiträume bei Raumtemperatur inkubiert.-Alle Ergebnisse wurden zum Vergleich der Inhibition normalisiert. **[A]** Vergleich der Inhibition mit und ohne NAD⁺-Vorinkubation bei 15 min. **[B]** Vergleich der Inhibition mit und ohne NAD⁺-Vorinkubation nach 30 min. *Verbindung **SD-1** hat eine höhere Aktivitätsrate, da **SD-1** selbst ein gutes SIRT2-Substrat ist und mit der Zeit von SIRT2 umgesetzt wird.

Der IC_{50} -Wert von **SD-CF-2** lag mit 13.06 ± 4.16 nM im Vergleich zu **SD-2** (15.40 ± 1.74 nM) im gleichen Bereich. (Tab. 11). Es konnte ein K_D -Wert von 275 ± 41.0 nM für die Bindung von **SD-CF-2** an SIRT2 bestimmt werden (Abb. 22). NAD⁺ verbesserte die Bindung von **SD-CF-2** an SIRT2 um das bis zu 70-Fache ($K_D = 3.8 \pm 4.4$ nM) (Abb.S93a). Dieser Wert lag im gleichen Bereich wie der berechnete K_i -Wert für **SD-2** mit 3 nM. Im nächsten Schritt wurden die K_D -Werte von SIRT3, SIRT5 und SIRT6 gegen **SD-CF-2** analysiert, wobei festgestellt werden konnte, dass sowohl SIRT3 als auch SIRT5 mit einem K_D -Wert von über 10000 nM um das 36-Fache schlechter binden als SIRT2. Gegen SIRT6 konnte bis 50 μM gar

keine Bindung detektiert werden. Das zeigte die hohe Spezifität der SIRT2-Inhibition von **SD-CF-2** (Abb. 22). Um zu zeigen das **SD-CF-2** mit den Substrat-Peptiden konkurriert wurden Verdrängungsmessungen nach Methode 2.3.6 durchgeführt. **SD-CF-2** wurde mit verschiedenen TNF α -Myr/NO₂ Konzentrationen gegen SIRT2 gemessen und mit höher werdenden TNF α -Myr/NO₂ Konzentration sank der K_D-Wert von **SD-CF-2** gegen SIRT2. Mit 2 μ M TNF α -Myr/NO₂ verschlechterte sich der K_D-Wert um da 6-Fache und mit 5 μ M um das 12.5 Fache. Der K_D-Wert verschlechterte sich um den gleichen Faktor wie sich die Konzentration erhöhte. Mit 10 μ M konnte gar keine Bindung mehr detektiert werden. Das zeigte, dass das Peptid-Derivat **SD-CF-2** mit den Substrat-Peptid um die Substratbindesstelle konkurriert. (Abb. S93b)

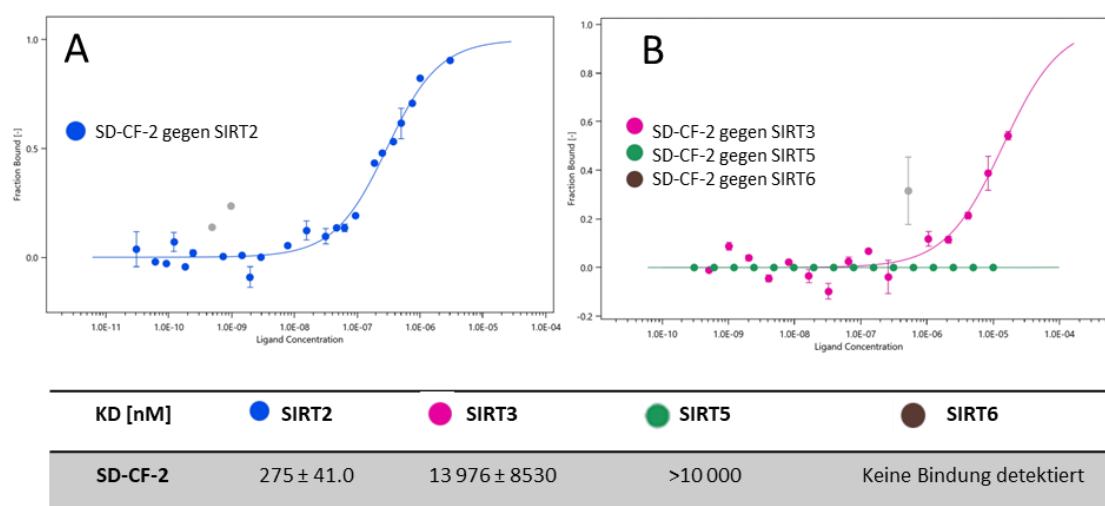


Abbildung 22: Bindungsmessung mit MST: **[A]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **SD-CF-2** für SIRT2 (Blau) **[B]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **SD-CF-2** für SIRT3 (Pink), SIRT5 (Grün) und SIRT6 (Braun), wobei keine Kurve dargestellt wird, weil keine Bindung detektiert wurde. Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 % und MST-Leistung 40 %

Die Messungen wurden *verse in versa* mit Histag-SIRT2 und den **SD**-Derivaten vermessen. Als Kontrollmessungen wurden wieder die Substrate mit TNF α -Ac/NO₂ und TNF α -Myr/NO₂ verwendet. TNF α -Ac/NO₂ zeigte einen K_D-Wert von über 317 μ M, also mehr als das 10-Fache vom K_M-Wert, während der K_D-Wert gegen TNF α -Myr/NO₂ bei 33 nM lag und somit im gleichen Bereich wie der K_M-Wert. Für den direkten Vergleich mit dem TNF α -Rückgrat wurde **SD-2** vermessen und zeigte einen K_D-Wert von 6.3 ± 3.9 nM. Die 20-Fach höhere Affinität gegen über **SD-CF-2**/SIRT2 lässt sich durch die zusätzliche Bindung des TNF α -Rückgrats erklären. Durch die Kürzung auf das Di-Peptid-**SD-KK-2** verschlechterte sich der K_D-Wert um das 16-Fache auf 1092 ± 279.8 nM. Die erneute Verkürzung auf das Lysin-Derivat **SD-K-2** zeigte einen K_D-Wert von 1573 ± 256.6 nM und nur eine 0.5-fache Verschlechterung gegenüber dem Di-Peptidderivat. (Abb.23c) Das zeigt das ein großer Teil Affinität in diesem Bereich von der fettacylierte Modifikationen kommt, die im hydrophoben Tunnel festbindet. [40]

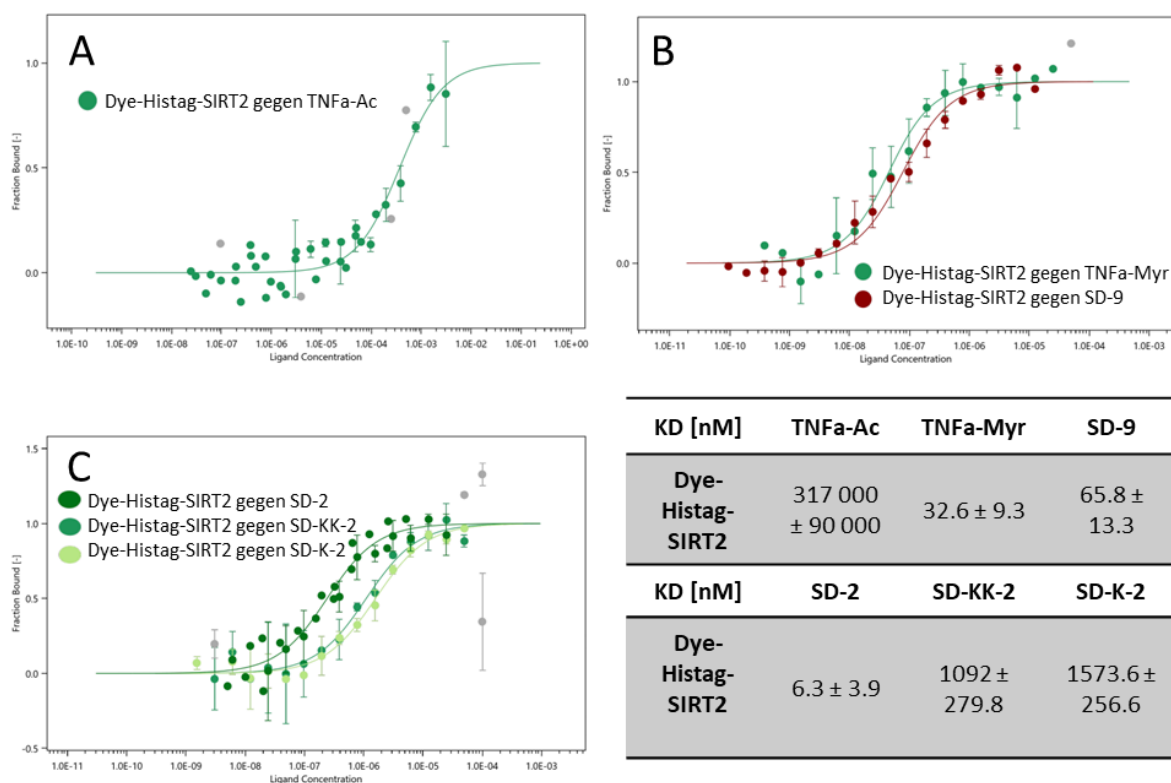


Abbildung 23 : Bindungsmessung mit MST von Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit : **[A]** Dosis-Wirkungs-Analyse für TNFα-Ac/NO₂(Grün) **[B]** Dosis-Wirkungs-Analyse von TNFα-Myr/NO₂ (Grün) und **SD-9** (Dunkelrot) **[C]** Dosis-Wirkungs-Analyse von **SD-2** (DunkelGrün) **SD-KK-2**(Grün) und **SD-K-2** (Hellgrün), Nano-RED-Anregungsleistung 80 % und MST-Leistung 40 %

Da mit dem Histag-SIRT2 reproduzierbare K_D -Werte bestimmt werden konnten, wurden die anderen **SD**-Peptid-Derivate Analog vermessen und miteinander verglichen. (Tab. 15) Übereinstimmend mit den vorangegangenen Ergebnissen sah man eine Korrelation der K_D -Werte und steigender Methylgruppen Anzahl an der 3-Position. Mit jeder zusätzlichen Methylgruppe hat sich der K_D -Wert jeweils um das doppelte verbessert. **SD-1** (0 Methylgruppen) mit einem K_D -Wert von 12.8 ± 5.9 nM auf **SD-2** (1 Methylgruppe) mit 6.3 ± 3.9 nM auf **SD-3** (2 Methylgruppen) mit einem K_D -Wert von 3.4 ± 2.8 nM. Interessanterweise zeigte **SD-7** ebenfalls einen K_D -Wert von 3.4 ± 2.4 nM und war damit genauso affin wie SD-3. (Abb.S99).

Tabelle 15: K_D -Werte der Peptid-Derivate SD-1 bis 9 und sowie SD-KK-2 und SD-K-2 gegen Histag-SIRT2

| Peptid-Derivate | K_D [nM] gegen Dye-Histag-SIRT2 | Peptid-Derivate | K_D [nM] gegen Dye-Histag-SIRT2 |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| SD-1 | 12.8 ± 5.9 | SD-7 | 3.4 ± 2.4 |
| SD-2 | 6.3 ± 3.9 | SD-8 | 1392 ± 294 |
| SD-3 | 3.4 ± 2.8 | SD-9 | 65.8 ± 13.3 |
| SD-4.1 | 24.8 ± 7.9 | SD-KK-2 | 1092 ± 279.8 |
| SD-4.2 | 24.5 ± 11.4 | SD-K-2 | 1573.6 ± 256.6 |
| SD-5 | 4.3 ± 2.3 | TNFα-Ac | $317\ 000 \pm 90\ 000$ |
| SD-6 | 4.2 ± 0.6 | TNFα-Myr | 32.6 ± 9.3 |

Peptid-Derivat **SD-8** mit mehreren Methylverzweigungen, unter anderem an der 2-Position zeigte hingegen einen 500-fach schlechteren K_D -Wert von 1392 ± 294 nM. **SD-8** hat eine Kettenlänge von C15 und Methylierungen in Position 2, 6, 10 und 14, während **SD-7** eine Kettenlänge von C16 aufweist und Methylierungen an Position 3, 7, 11 und 15. Da es zwischen diesen beiden Derivaten zu viele Faktoren gibt, die für die unterschiedliche Affinität verantwortlich sein könnten, wurden die Peptid-Derivate **SD-5** (1 Methylgruppe) und **SD-6** (2 Methylgruppen) an 2 Position, sowie **SD-4** mit je einer Methylierung an 2- und 3-Position synthetisiert. Bei **SD-4** konnten zwei Diastereomere fraktioniert werden, welche mit **SD-4.1** und **SD-4.2** benannt wurden, da die genaue Stereochemie nicht ermittelt werden konnte. Während **SD-5** und **SD-6** ebenfalls eine hohe Affinität, mit einem K_D von 4.2 nM aufweisen konnten, verschlechterte sich dieser bei **SD-4.1** und **SD-4.2** um das 7-Fache. Auf 24 nM. Eine gemischte Methylierung schien also ungünstig für die Affinität gegenüber SIRT2 zu sein, welche aber jedoch keine großen Auswirkungen auf Inhibierung gegen TNF α -Myr/NO $_2$ hatte ($IC_{50} = 0.5$ μ M). **SD-5** und **SD-6** zeigten IC_{50} -Werte im gleichen Bereich wie **SD-2** und **SD-3** (Tab. S3) Somit scheinen Methylierungen in der 2- und 3-Position eine Drehung der Amid-Bindung zu bewirken, wodurch Pseudoinhibitoren entstehen, die nicht nur hochaffin binden, sondern auch potent gegen SIRT2 inhibieren

4. Zusammenfassung und Ausblick

Begonnen wurde mit der Entwicklung von SIRT5 Peptid-Derivaten, indem verschiedene Succinyl-Derivat-Modifikationen synthetisiert wurden. Dafür wurde eine einfache Reaktion über die Michael-Addition entwickelt. Anschließend wurde begonnen, die Wirkung des Peptidrückgrats zur Affinität der (S)-3-(2-Naphthylmercapto)succinyl-Derivate zu analysieren. Die Peptidsequenz wurde zu einem Tripeptid verkürzt und **S5i-LKA-33(S)** synthetisiert (Tabelle 6). Dieses Tripeptid bindet 6-mal schwächer an SIRT5 als **S5i-BT-33(S)**, aber immer noch im unteren mikromolaren Bereich. Die Herstellung eines α -acetylierten Lysinamids, das mit der (S)-3-(2-Naphthylmercapto)succinyl-Gruppe an der ϵ -Aminogruppe acyliert ist, führte zu **S5i-SMa-33**, das einen K_i -Wert von 7 μ M aufweist, der etwa 40-Fach höher ist als der K_i -Wert für **S5i-LKA-33(S)**, aber nahe an den Werten der stärksten bisher bekannten selektiven Sirt5-Inhibitoren liegt. Das Peptidrückgrat der peptidischen Inhibitoren trägt also zur Affinität und Potenz bei. Eine weitere Verkürzung durch die Entfernung des acetylierten Glycinamidteils von **S5i-SMa-33** ergab **S5i-SMb-33**, das im Vergleich zu **S5i-SMa-33** etwa 20-mal weniger effektiv an SIRT5 bindete. Der Ersatz des Butylamid-Teils in **S5i-SMb-33** durch Anilide (**S5i-SMc-33** und **S5i-SMd-33**) und Benzylamid (**S5i-SMe-33**) wurde gut vertragen und führte zu ähnlichen IC_{50} -Werten (Tab. 7). Der Ersatz der Methylgruppe in **S5i-SMb-33** durch einen Phenylring (**S5i-SMf-33**) verbesserte den IC_{50} -Wert bereits um mehr als das 2-Fache und die Strukturdaten bieten eine Grundlage für die weitere Optimierung dieses Verbindungsteils, um Potenzen zu erzielen, die mit denen von **S5i-SMa-33** vergleichbar oder potenter sein könnten, was für „drug targets“ essenziell ist. Zum Vergleich wurden die bekannten niedermolekularen Inhibitoren IV und VII (Tab. S 11) unter ähnlichen Testbedingungen analysiert. Beide Derivate zeigten eine viel schwächere Affinität zu SIRT5. Zusammenfassend für den SIRT5-Abschnitt zeigen diese Ergebnisse, dass das (S)-3-(2-Naphthylmercapto)succinylamid-Gerüst einen nützlichen Ausgangspunkt für die systematische Entwicklung kleiner Moleküle darstellt, die wirksam und selektiv auf SIRT5 inhibieren. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde außerdem eine peptidbasierte selektive SIRT5-Affinitätssonde (**S5i-BT-33(S)**), entwickelt, indem die Acyleinheit systematisch optimiert wurde. Das Sondendesign wurde durch die Analyse einer bekannten Kristallstruktur von SIRT5 im Komplex mit 47 und den in dieser Studie gelösten Kristallstrukturen geleitet. Die entwickelte Affinitätssonde **S5i-BT-33(S)** ist in der Lage, an SIRT5 in verschiedenen Matrizes und Umgebungen zu binden, wobei sie eine hohe Selektivität und inhibierende Aktivität aufweist. Die hohe Wirksamkeit ist auf die langsame Dissoziationsrate und die schnelle Assoziation des Inhibitor-Enzym-Komplexes zurückzuführen, was diese Sonde zu einem multifunktionalen Werkzeug für die Untersuchung der SIRT5-Biologie auf einer neuen Ebene macht.

Durch den Austausch des CPS1 auf das TNF α -Peptidrückgrat wurde ebenfalls eine inhibitorische Modifikation für eine effektive und selektive Inhibition von SIRT2 identifiziert. Im Gegensatz zu anderen Peptid-Basierten Inhibitoren, wie z.B. Mechanismus basierten Inhibitoren mit einem Thioamid-, oder Thiourea-*Warhead*, besitzen die hier beschriebenen Peptid-Derivate eine stabile Amid-Bindung. Es ist daher zu erwarten, dass die entwickelten Verbindungen im Serum und in Zellen metabolisch stabiler sind. Abhängig von der Länge der Acylkette sind offensichtlich zwei verschiedene Bindungsmodi möglich, die sich im Mechanismus der Inhibition und der Isoformselektivität unterscheiden. Dennoch ergeben beide Bindungsmodi hochpotente SIRT2-Inhibitoren. Buttersäurederivate (z. B. **S2i-9**), ermöglichen eine zusätzliche NAD⁺-Bindung, und der ternäre Komplex, bestehend aus SIRT2, **S2i-9** und NAD⁺ zeigt stabilere Dissoziation konstanten, was durch niedrige k_{off} -Werte und eine höhere Denaturierungstemperatur dargestellt wird (Abb. 21).

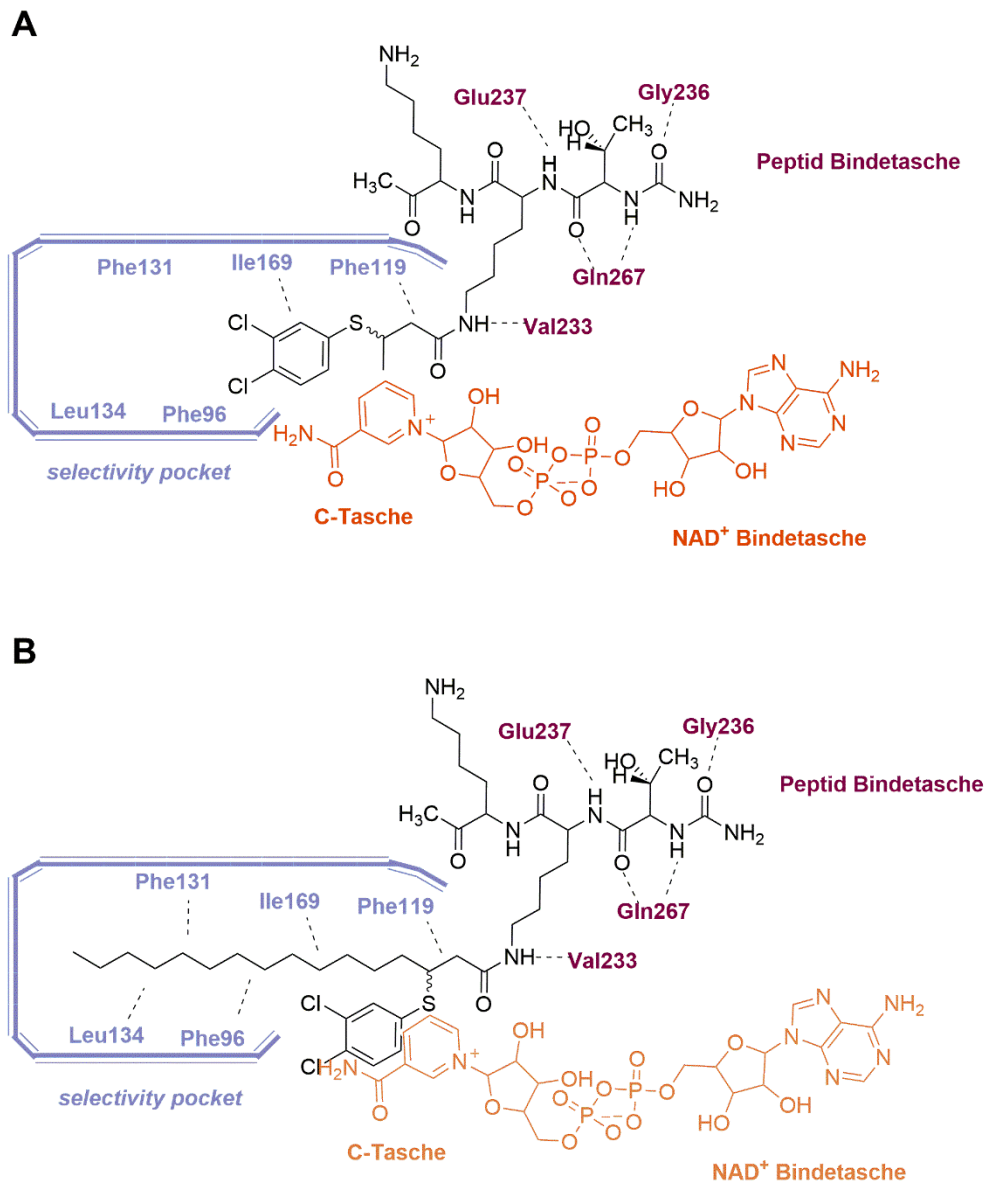


Abbildung 24: [A] Bindungsmodus von Peptid-Derivat **S2i-9**, welcher partiell und nicht-kompetitiv gegen NAD⁺ an SIRT2 bindet [B] Bindungsmodus von Peptid-Derivat **S2i-14**, welcher kompetitiv gegen NAD⁺ an SIRT2 bindet

Die Buttersäurederivate sind keine Substrate (Abb. S60). für SIRT2, da der 3-Aryl-Mercapto-Anteil an die Selektivitätstasche von SIRT2 bindet und eine Umlagerung des aktiven Zentrums ähnlich wie bei SirReals bewirkt. Dieser Bindungsmodus könnte sowohl die hohe SIRT2-Selektivität der Buttersäurederivate als auch die teilweise nicht-kompetitive Inhibition gegenüber NAD⁺ erklären. (Abb. 24A) Eine Verlängerung der Acylkette, die zu Nonanoylderivaten führt, bewirkt einen Wechsel des Bindungsmodus, der dem Bindungsmodus (Abb.24B) von an SIRT5 gebundenem **S5i-9.1** ähnelt. Dieser ist durch die Verhinderung der Bindung des Co-Substrats NAD⁺ gekennzeichnet (Abb. 21). Eine zusätzliche Verlängerung der Acylkette, die zu dem palmitoylierten Peptidderivat **S2i-14** führte, ergab einen Inhibitor mit ähnlichem Bindungsmodus, aber verbesserten kinetischen Konstanten aufgrund zusätzlicher Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Tunnel von SIRT2 (Abb. 19). Folglich ist der IC₅₀-Wert von **S2i-14** im Vergleich zum nicht-anoylierten Derivat **S2i-12** etwa 8-fach verbessert.

In Übereinstimmung mit dem vermuteten Bindungsmodus für das nicht-acylierte Derivat **S2i-12** werden sowohl die Bindung von SIRT2 an immobilisiertes **S2i-BT-12** (Abb. 16) als auch die Bindung von **S2i-CF-12** an SIRT2 (Abb. 17) durch die Anwesenheit von NAD⁺ aufgrund von Konkurrenz in der C-Bindetasche negativ beeinflusst (Abb. 17). Mit K_D-Werten im unteren nanomolaren Bereich und sehr langsamen k_{off}-Werten (Abb. 17) jedoch inhibierten all dies S2i-Derivate nur gegen Acetyliertes Substrat-Peptid, womit die **S2i**-Peptid-Derivate gleichauf mit so vielen anderen veröffentlichten Derivaten stehen.

Schlussendlich wurden durch die Ersetzung der Phenylmodifikationen zu langkettigen fettacylierte Modifikationen Pseudo-Inhibitoren entwickelt die nicht nur gegen acetyliertes, sondern auch gegen myristoyliertes Substrat-Peptid inhibieren. Mit einführen von Methylgruppen an 3-Position konnten Inhibitoren entwickelt werden, die im unteren mikromolaren IC₅₀ Bereich inhibieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die **SD**-Peptid-Derivate nicht nur als Inhibitoren, sondern auch als Substrate fungieren Diese sind jedoch so langsam, dass sie als Pseudo-Inhibitoren fungieren. [66] Je mehr Methylgruppen an der 3-Position binden desto schlechter wurde der k_{cat}/K_M, wobei dieser Effekt durch die starke Verringerung des k_{cat} kam. Die Affinität war bei allen gemessenen **SD**-Peptid-Derivaten ähnlich dem myristoylierten TNFα-Derivat. Außerdem konnte mittels MST-Messungen gezeigt werden, dass die **SD**-Peptid-Derivate alle im nanomolaren Bereich an SIRT2 binden und das z.T. affiner als an TNFα-Myr/NO₂ (Abb. S99-102 und Tab. 15) der Einfluss des Peptidrückgrats wurde anhand von **SD-2** untersucht. Mit Verkürzung auf das Di-Peptid-Derivat **SD-KK-2** verschlechterte sich der K_D-Wert um das 5-Fache, eine weitere Verkürzung auf das Lysin-Derivat jedoch nur um das 0.5-Fache. Das zeigte das der langkettige Acylrest mit dem Phenylalaninen im hydrophoben Tunnel genug Wechselwirkungen eingeht um selbst im unteren mikromolaren Bereich zu binden [40], wobei Myristoysäure allein nicht an SIRT2 bindet. **SD-2** war ebenfalls wie **S2i-9** und **S2i-12** nicht nur hochaffin, sondern auch selektiv gegenüber den anderen SIRTUINEN, weil es genau wie Inhibitor **S2i-9** in Richtung der *selectivity pocket* bindet. (Abb. 24A) Das zeigten die MST-Ergebnisse wo NAD⁺ zusätzlich an **SD-CF-2** und SIRT2 bindet und der Komplex um das 70-Fache stabiler war (K_D von 3.8 nM) als **SDCF-2**/SIRT2 komplex (K_D von 275 nM) allein.

Das der Inhibierungsmechanismus der Methylierungen an 3- und 2-Position *stalled intermediate* basiert war, wie bei den Inhibitoren TM und JH-T4 mit den *Thioamid-warheads* [115, 116] konnte durch das Experiment mit der Vornikubation mit NAD⁺ ausgeschlossen werden, da sich die IC₅₀-Werte nicht veränderten, weswegen die Inhibition eher auf eine Amid-Verdrehung durch die Methylierung schließt. Durch die Verdrehung erfolgt ein verlangsamter nukloephiler Angriff der ADP-Ribose. Diesen Effekt wurde auch schon in Roessler et al. (2014) mit der Methylierung in 3-Position von SIRT5-Peptid-Derivaten beschrieben. Da der Reaktionsmechanismus allgemein für SIRTUINE gilt, könnte dies kleine Modifikation an 3 und 2-Position nicht nur bei SIRT5 sondern auch bei SIRT2, die ebenfalls zu erniedrigten k_{cat} Effekten führten, für die nanomolaren Inhibition gegen myristoyliertes Substrat-Peptid verantwortlich sein.

Um die Inhibitionsmechanismen besser verstehen zu können, ist es sinnvoll die Peptid-Derivate **SD-5**, **SD-6** und **SD-8** genauer zu charakterisieren, wie es mit den Peptid-Derivaten **SD-1,2** und **3** geschah. Außerdem sollte die Nikotinamidfreisetzung untersucht, Computermodelle generiert und im besten Fall Kristallstrukturen erzeugt werden, um zwischen sterischer Hinderung und Verdrehung unterscheiden zu können. Nachfolgend ist es auch interessant zu untersuchen wieviel Einfluss der Schwefel auf die Inhibierung hat und wieviel auf die Verdrehung durch die Methylierung zurückzuführen ist. Die beiden Inhibitoren **SD-7** und **SD-8** mit ihren ebenfalls potenten IC_{50} -Werten von $1.02 \pm 0.26 \mu\text{M}$ und $2.69 \pm 0.32 \mu\text{M}$ (Abb. S75 und S76) gegen myristoyliertes Substrat lassen vermuten, dass die Methylierung einen größeren Einfluss als der Schwefel in der 4-Position hat.

Somit haben wir im letzten Abschnitt dieser Arbeit die bislang effektivsten und selektive SIRT2 Inhibitoren entwickelt welche nicht nur gegen acetyliertes, sondern auch myristoyliertes Substrat-Peptid inhibieren. Selbst Inhibitoren wie TM, JH-T4 oder NH4-6, die ebenfalls langsam umgesetzt werden, inhibieren nur gegen myristoyliertes Substrat-Peptid, wenn eine Vorinkubation stattfindet und nicht direkt. [17, 66] Die hier beschriebenen **SD**-Peptid-Derivate, die weder einen Thioura- noch einen Thioamid-*Warhead* besitzen, hingegen inhibieren direkt ohne Vorinkubation. Außerdem sind Sie im Gegensatz zu den Thioamid-basierten Pseudoinhibitoren nicht Zelltoxisch und somit sehr gute Ausgangspunkte für die Entwicklung wirksamer und selektiver „*drug targets*“ *in vivo*.

5. Referenzen

References

1. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J.* 1984;219:345–73. doi:10.1042/bj2190345.
2. Park J, Chen Y, Tishkoff DX, Peng C, Tan M, Dai L, et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell.* 2013;50:919–30. doi:10.1016/j.molcel.2013.06.001.
3. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003;21:255–61. doi:10.1038/nbt0303-255.
4. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44:7342–72. doi:10.1002/anie.200501023.
5. Rauh D, Fischer F, Gertz M, Lakshminarasimhan M, Bergbrede T, Aladini F, et al. An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat Commun.* 2013;4:2327. doi:10.1038/ncomms3327.
6. Cornish-Bowden A. The origins of enzyme kinetics. *FEBS Lett.* 2013;587:2725–30. doi:10.1016/j.febslet.2013.06.009.
7. Eberharter A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 2002;3:224–9. doi:10.1093/embo-reports/kvf053.
8. Huang Z, Zhao J, Deng W, Chen Y, Shang J, Song K, et al. Identification of a cellularly active SIRT6 allosteric activator. *Nat Chem Biol.* 2018;14:1118–26. doi:10.1038/s41589-018-0150-0.
9. Gregoret IV, Lee Y-M, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol.* 2004;338:17–31. doi:10.1016/j.jmb.2004.02.006.
10. Lombardi PM, Cole KE, Dowling DP, Christianson DW. Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 2011;21:735–43. doi:10.1016/j.sbi.2011.08.004.
11. Kutil Z, Skultetyova L, Rauh D, Meleshin M, Snajdr I, Novakova Z, et al. The unraveling of substrate specificity of histone deacetylase 6 domains using acetylome peptide microarrays and peptide libraries. *FASEB J.* 2019;33:4035–45. doi:10.1096/fj.201801680R.
12. Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T, Mazitschek R. Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat Chem Biol.* 2010;6:238–43. doi:10.1038/nchembio.313.
13. Kutil Z, Novakova Z, Meleshin M, Mikesova J, Schutkowski M, Barinka C. Histone Deacetylase 11 Is a Fatty-Acid Deacylase. *ACS Chem Biol.* 2018;13:685–93. doi:10.1021/acscchembio.7b00942.
14. Moreno-Yruela C, Galleano I, Madsen AS, Olsen CA. Histone Deacetylase 11 Is an ϵ -N-Myristoyllysine Hydrolase. *Cell Chem Biol.* 2018;25:849–856.e8. doi:10.1016/j.chembiol.2018.04.007.
15. Cao J, Sun L, Aramsangtienchai P, Spiegelman NA, Zhang X, Huang W, et al. HDAC11 regulates type I interferon signaling through defatty-acylation of SHMT2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116:5487–92. doi:10.1073/pnas.1815365116.

16. Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM. Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem.* 2012;287:42419–27. doi:10.1074/jbc.R112.378877.
17. Roshdy E, Mustafa M, Shaltout AE-R, Radwan MO, Ibrahim MAA, Soliman ME, et al. Selective SIRT2 inhibitors as promising anticancer therapeutics: An update from 2016 to 2020. *Eur J Med Chem.* 2021;224:113709. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113709.
18. Harting K, Knöll B. SIRT2-mediated protein deacetylation: An emerging key regulator in brain physiology and pathology. *Eur J Cell Biol.* 2010;89:262–9. doi:10.1016/j.ejcb.2009.11.006.
19. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:793–8. doi:10.1006/bbrc.2000.3000.
20. Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* 1995;9:2888–902. doi:10.1101/gad.9.23.2888.
21. Braunstein M, Sobel RE, Allis CD, Turner BM, Broach JR. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4349–56. doi:10.1128/mcb.16.8.4349.
22. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell.* 2004;16:93–105. doi:10.1016/j.molcel.2004.08.031.
23. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:225–38. doi:10.1038/nrm3293.
24. Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem.* 2005;280:21313–20. doi:10.1074/jbc.M413296200.
25. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;303:2011–5. doi:10.1126/science.1094637.
26. Feldman JL, Baeza J, Denu JM. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J Biol Chem.* 2013;288:31350–6. doi:10.1074/jbc.C113.511261.
27. He W, Newman JC, Wang MZ, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:467–76. doi:10.1016/j.tem.2012.07.004.
28. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell.* 2006;126:941–54. doi:10.1016/j.cell.2006.06.057.
29. Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science.* 2011;334:806–9. doi:10.1126/science.1207861.
30. Wang WW, Zeng Y, Wu B, Deiters A, Liu WR. A Chemical Biology Approach to Reveal Sirt6-targeted Histone H3 Sites in Nucleosomes. *ACS Chem Biol.* 2016;11:1973–81. doi:10.1021/acscchembio.6b00243.
31. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 2009;136:62–74. doi:10.1016/j.cell.2008.10.052.
32. Jiang H, Khan S, Wang Y, Charron G, He B, Sebastian C, et al. SIRT6 regulates TNF- α secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature.* 2013;496:110–3. doi:10.1038/nature12038.

33. Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*. 2008;102:703–10. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164558.
34. Sauve AA. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:1591–603. doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.021.
35. Zhao K, Harshaw R, Chai X, Marmorstein R. Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:8563–8. doi:10.1073/pnas.0401057101.
36. Smith BC, Denu JM. Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases. *J Biol Chem*. 2007;282:37256–65. doi:10.1074/jbc.M707878200.
37. Landry J, Slama JT, Sternglanz R. Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278:685–90. doi:10.1006/bbrc.2000.3854.
38. Sanders BD, Jackson B, Marmorstein R. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:1604–16. doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.009.
39. Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, et al. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure*. 2014;22:345–52. doi:10.1016/j.str.2013.12.001.
40. Teng Y-B, Jing H, Aramsangtienchai P, He B, Khan S, Hu J, et al. Efficient demyristoylase activity of SIRT2 revealed by kinetic and structural studies. *Sci Rep*. 2015;5:8529. doi:10.1038/srep08529.
41. Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng H-L, Alt FW, et al. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev*. 2006;20:1256–61. doi:10.1101/gad.1412706.
42. Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Oshimura M. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2007;6:1011–8. doi:10.4161/cc.6.9.4219.
43. Black JC, Mosley A, Kitada T, Washburn M, Carey M. The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol Cell*. 2008;32:449–55. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.018.
44. Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Lüscher B, Hottiger MO. SIRT2 regulates NF- κ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci*. 2010;123:4251–8. doi:10.1242/jcs.073783.
45. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*. 2003;11:437–44.
46. Kozako T, Mellini P, Ohsugi T, Aikawa A, Uchida Y-I, Honda S-I, Suzuki T. Novel small molecule SIRT2 inhibitors induce cell death in leukemic cell lines. *BMC Cancer*. 2018;18:791. doi:10.1186/s12885-018-4710-1.
47. He X, Nie H, Hong Y, Sheng C, Xia W, Ying W. SIRT2 activity is required for the survival of C6 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417:468–72. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.141.
48. Chen J, Chan AWH, To K-F, Chen W, Zhang Z, Ren J, et al. SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling. *Hepatology*. 2013;57:2287–98. doi:10.1002/hep.26278.
49. Funato K, Hayashi T, Echizen K, Negishi L, Shimizu N, Koyama-Nasu R, et al. SIRT2-mediated inactivation of p73 is required for glioblastoma tumorigenicity. *EMBO Rep* 2018. doi:10.15252/embr.201745587.
50. Pandithage R, Lilischkis R, Harting K, Wolf A, Jedamzik B, Luscher-Firzlaff J, et al. The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol*. 2008;180:915–29. doi:10.1083/jcb.200707126.
51. Zhu H, Zhao L, Wang E, Dimova N, Liu G, Feng Y, Cambi F. The QKI-PLP pathway controls SIRT2 abundance in CNS myelin. *Glia*. 2012;60:69–82. doi:10.1002/glia.21248.

52. Outeiro TF, Kontopoulos E, Altmann SM, Kufareva I, Strathearn KE, Amore AM, et al. Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science*. 2007;317:516–9. doi:10.1126/science.1143780.
53. Pallos J, Bodai L, Lukacsovich T, Purcell JM, Steffan JS, Thompson LM, Marsh JL. Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2008;17:3767–75. doi:10.1093/hmg/ddn273.
54. Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, et al. SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:7927–32. doi:10.1073/pnas.1002924107.
55. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839–40. doi:10.1038/42166.
56. Kim H-S, Vassilopoulos A, Wang R-H, Lahusen T, Xiao Z, Xu X, et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell*. 2011;20:487–99. doi:10.1016/j.ccr.2011.09.004.
57. Yang MH, Laurent G, Bause AS, Spang R, German N, Haigis MC, Haigis KM. HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS. *Mol Cancer Res*. 2013;11:1072–7. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0040-T.
58. Gertz M, Fischer F, Nguyen GTT, Lakshminarasimhan M, Schutkowski M, Weyand M, Steegborn C. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E2772-81. doi:10.1073/pnas.1303628110.
59. Schuetz A, Min J, Antoshenko T, Wang C-L, Allali-Hassani A, Dong A, et al. Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. *Structure*. 2007;15:377–89. doi:10.1016/j.str.2007.02.002.
60. Napper AD, Hixon J, McDonagh T, Keavey K, Pons J-F, Barker J, et al. Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem*. 2005;48:8045–54. doi:10.1021/jm050522v.
61. Peck B, Chen C-Y, Ho K-K, Di Fruscia P, Myatt SS, Coombes RC, et al. SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Mol Cancer Ther*. 2010;9:844–55. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0971.
62. Hoffmann G, Breitenbücher F, Schuler M, Ehrenhofer-Murray AE. A novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitor with p53-dependent pro-apoptotic activity in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem*. 2014;289:5208–16. doi:10.1074/jbc.M113.487736.
63. Rumpf T, Schiedel M, Karaman B, Roessler C, North BJ, Lehotzky A, et al. Selective Sirt2 inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site. *Nat Commun*. 2015;6:6263. doi:10.1038/ncomms7263.
64. Kudo N, Ito A, Arata M, Nakata A, Yoshida M. Identification of a novel small molecule that inhibits deacetylase but not defatty-acylase reaction catalysed by SIRT2. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 2018. doi:10.1098/rstb.2017.0070.
65. Farooqi AS, Hong JY, Cao J, Lu X, Price IR, Zhao Q, et al. Novel Lysine-Based Thioureas as Mechanism-Based Inhibitors of Sirtuin 2 (SIRT2) with Anticancer Activity in a Colorectal Cancer Murine Model. *J Med Chem* 2019. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00191.
66. Spiegelman NA, Price IR, Jing H, Wang M, Yang M, Cao J, et al. Direct Comparison of SIRT2 Inhibitors: Potency, Specificity, Activity-Dependent Inhibition, and On-target Anticancer Activities. *ChemMedChem* 2018. doi:10.1002/cmdc.201800391.
67. Kawaguchi M, Ieda N, Nakagawa H. Development of Peptide-Based Sirtuin Defatty-Acylase Inhibitors Identified by the Fluorescence Probe, SFP3, That Can Efficiently Measure Defatty-Acylase Activity of Sirtuin. *J Med Chem*. 2019;62:5434–52. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00315.

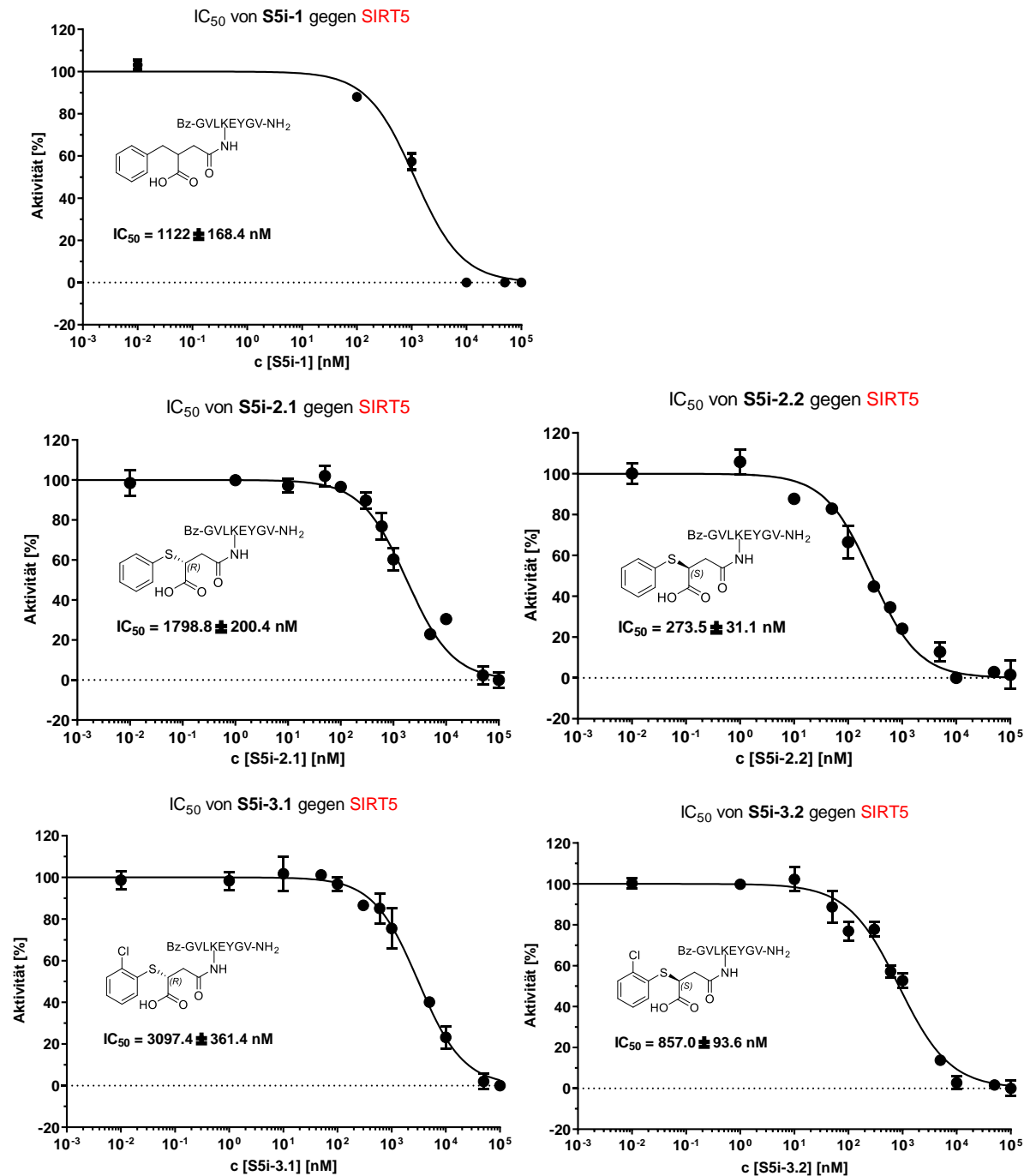
68. Zessin M, Meleshin M, Simic Z, Kalbas D, Arbach M, Gebhardt P, et al. Continuous Sirtuin/HDAC (histone deacetylase) activity assay using thioamides as PET (Photoinduced Electron Transfer)-based fluorescence quencher. *Bioorg Chem.* 2021;117:105425. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105425.
69. Yang L, Ma X, He Y, Yuan C, Chen Q, Li G, Chen X. Sirtuin 5: a review of structure, known inhibitors and clues for developing new inhibitors. *Sci China Life Sci.* 2017;60:249–56. doi:10.1007/s11427-016-0060-7.
70. Yang L-L, He Y-Y, Chen Q-L, Qian S, Wang Z-Y. Design and Synthesis of New 9-Substituted Norharmane Derivatives as Potential Sirt5 Inhibitors. *J. Heterocyclic Chem.* 2017;54:1457–66. doi:10.1002/jhet.2732.
71. Zhou L, Wang F, Sun R, Chen X, Zhang M, Xu Q, et al. SIRT5 promotes IDH2 desuccinylation and G6PD deglutarylation to enhance cellular antioxidant defense. *EMBO Rep.* 2016;17:811–22. doi:10.15252/embr.201541643.
72. Boylston JA, Sun J, Chen Y, Gucek M, Sack MN, Murphy E. Characterization of the cardiac succinylome and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;88:73–81. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.09.005.
73. Rardin MJ, He W, Nishida Y, Newman JC, Carrico C, Danielson SR, et al. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab.* 2013;18:920–33. doi:10.1016/j.cmet.2013.11.013.
74. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell.* 2009;137:560–70. doi:10.1016/j.cell.2009.02.026.
75. Tan M, Peng C, Anderson KA, Chhoy P, Xie Z, Dai L, et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab.* 2014;19:605–17. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.014.
76. Yu J, Sadhukhan S, Noriega LG, Moullan N, He B, Weiss RS, et al. Metabolic characterization of a Sirt5 deficient mouse model. *Sci Rep.* 2013;3:2806. doi:10.1038/srep02806.
77. Tang Z, Li L, Tang Y, Xie D, Wu K, Wei W, Xiao Q. CDK2 positively regulates aerobic glycolysis by suppressing SIRT5 in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2018;109:2590–8. doi:10.1111/cas.13691.
78. Xu L, Che X, Wu Y, Song N, Shi S, Wang S, et al. SIRT5 as a biomarker for response to anthracycline-taxane-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Oncol Rep.* 2018;39:2315–23. doi:10.3892/or.2018.6319.
79. Ren M, Yang X, Bie J, Wang Z, Liu M, Li Y, et al. Citrate synthase desuccinylation by SIRT5 promotes colon cancer cell proliferation and migration. *Biol Chem* 2020. doi:10.1515/hsz-2020-0118.
80. Shi L, Yan H, An S, Shen M, Jia W, Zhang R, et al. SIRT5-mediated deacetylation of LDHB promotes autophagy and tumorigenesis in colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2019;13:358–75. doi:10.1002/1878-0261.12408.
81. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132:2557–76. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061.
82. Chang L, Xi L, Liu Y, Liu R, Wu Z, Jian Z. SIRT5 promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting E2F1. *Mol Med Rep.* 2018;17:342–9. doi:10.3892/mmr.2017.7875.
83. Di Zhang, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature.* 2019;574:575–80. doi:10.1038/s41586-019-1678-1.

84. Roessler C, Nowak T, Pannek M, Gertz M, Nguyen GTT, Scharfe M, et al. Chemical probing of the human sirtuin 5 active site reveals its substrate acyl specificity and peptide-based inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53:10728–32. doi:10.1002/anie.201402679.
85. He B, Du J, Lin H. Thiosuccinyl peptides as Sirt5-specific inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2012;134:1922–5. doi:10.1021/ja2090417.
86. Liu J, Huang Y, Zheng W. A Selective Cyclic Peptidic Human SIRT5 Inhibitor. *Molecules* 2016. doi:10.3390/molecules21091217.
87. Wang Y, Chen H, Zha X. Overview of SIRT5 as a potential therapeutic target: Structure, function and inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2022;236:114363. doi:10.1016/j.ejmech.2022.114363.
88. Zheng W. Sulfur-based mechanistic probes for enzyme-catalyzed reactions. *Curr Med Chem.* 2013;20:3743–58. doi:10.2174/09298673113209990177.
89. Schuster S, Roessler C, Meleshin M, Zimmermann P, Simic Z, Kambach C, et al. A continuous sirtuin activity assay without any coupling to enzymatic or chemical reactions. *Sci Rep.* 2016;6:22643. doi:10.1038/srep22643.
90. Rajendra G, Miller MJ. Oxidative cyclization of β,γ -unsaturated O-acyl hydroxamates to β -lactams. *Tetrahedron Letters.* 1985;26:5385–8. doi:10.1016/S0040-4039(00)98214-5.
91. Zienty FB, Vineyard BD, Schlepplnik AA. Base-Catalyzed Addition of Thiols to α,β -Unsaturated Anhydrides. *J. Org. Chem.* 1962;27:3140–6. doi:10.1021/jo01056a038.
92. Bartoschik T, Galinec S, Kleusch C, Walkiewicz K, Breitsprecher D, Weigert S, et al. Near-native, site-specific and purification-free protein labeling for quantitative protein interaction analysis by MicroScale Thermophoresis. *Sci Rep.* 2018;8:4977. doi:10.1038/s41598-018-23154-3.
93. Liebscher S, Schöpfel M, Aumüller T, Sharkhuukhen A, Pech A, Höss E, et al. N-terminal protein modification by substrate-activated reverse proteolysis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53:3024–8. doi:10.1002/anie.201307736.
94. Feldman JL, Dittenhafer-Reed KE, Kudo N, Thelen JN, Ito A, Yoshida M, Denu JM. Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD(+) Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. *Biochemistry.* 2015;54:3037–50. doi:10.1021/acs.biochem.5b00150.
95. Productions S. Molecular Operating Environment (MOE), 2012.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2012.
96. Jones G, Willett P, Glen RC. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol.* 1995;245:43–53. doi:10.1016/s0022-2836(95)80037-9.
97. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:235–42. doi:10.1093/nar/28.1.235.
98. Augustin M, Müller W. Synthese von N-Maleoyl-aminosäuren und -peptiden. *J. Prakt. Chem.* 1985;327:789–98. doi:10.1002/prac.19853270511.
99. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973;22:3099–108. doi:10.1016/0006-2952(73)90196-2.
100. Miller MJ, Bajwa JS, Mattingly PG, Peterson K. Enantioselective syntheses of 3-substituted 4-(alkoxycarbonyl)-2-azetidiones from malic acid. *J. Org. Chem.* 1982;47:4928–33. doi:10.1021/jo00146a020.
101. Mitsunobu O, Yamada M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *BCSJ.* 1967;40:2380–2. doi:10.1246/bcsj.40.2380.
102. Kalbas D, Liebscher S, Nowak T, Meleshin M, Pannek M, Popp C, et al. Potent and Selective Inhibitors of Human Sirtuin 5. *J Med Chem.* 2018;61:2460–71. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01648.

103. Harder E, Damm W, Maple J, Wu C, Reboul M, Xiang JY, et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J Chem Theory Comput.* 2016;12:281–96. doi:10.1021/acs.jctc.5b00864.
104. Morimoto J, Hayashi Y, Suga H. Discovery of macrocyclic peptides armed with a mechanism-based warhead: isoform-selective inhibition of human deacetylase SIRT2. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012;51:3423–7. doi:10.1002/anie.201108118.
105. Smith BC, Denu JM. Mechanism-based inhibition of Sir2 deacetylases by thioacetyl-lysine peptide. *Biochemistry.* 2007;46:14478–86. doi:10.1021/bi7013294.
106. Fatkins DG, Monnot AD, Zheng W. Nepsilon-thioacetyl-lysine: a multi-facet functional probe for enzymatic protein lysine Nepsilon-deacetylation. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16:3651–6. doi:10.1016/j.bmcl.2006.04.075.
107. Mellini P, Itoh Y, Elboray EE, Tsumoto H, Li Y, Suzuki M, et al. Identification of Diketopiperazine-Containing 2-Anilinobenzamides as Potent Sirtuin 2 (SIRT2)-Selective Inhibitors Targeting the "Selectivity Pocket", Substrate-Binding Site, and NAD⁺-Binding Site. *J Med Chem.* 2019;62:5844–62. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00255.
108. Mellini P, Itoh Y, Tsumoto H, Li Y, Suzuki M, Tokuda N, et al. Potent mechanism-based sirtuin-2-selective inhibition by an in situ-generated occupant of the substrate-binding site, "selectivity pocket" and NAD⁺-binding site. *Chem Sci.* 2017;8:6400–8. doi:10.1039/c7sc02738a.
109. Rumpf T, Gerhardt S, Einsle O, Jung M. Seeding for sirtuins: microseed matrix seeding to obtain crystals of human Sirt3 and Sirt2 suitable for soaking. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2015;71:1498–510. doi:10.1107/S2053230X15019986.
110. Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:730–9. doi:10.1038/nrd2082.
111. Sundriyal S, Moniot S, Mahmud Z, Yao S, Di Fruscia P, Reynolds CR, et al. Thienopyrimidinone Based Sirtuin-2 (SIRT2)-Selective Inhibitors Bind in the Ligand Induced Selectivity Pocket. *J Med Chem.* 2017;60:1928–45. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01690.
112. Alexander CG, Wanner R, Johnson CM, Breitsprecher D, Winter G, Duhr S, et al. Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844:2241–50. doi:10.1016/j.bbapap.2014.09.016.
113. Verhoeven NM, Jakobs C. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog Lipid Res.* 2001;40:453–66. doi:10.1016/s0163-7827(01)00011-x.
114. Wanders RJA, Komen J, Ferdinandusse S. Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1811:498–507. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.006.
115. Rajabi N, Nielsen AL, Olsen CA. Dethioacylation by Sirtuins 1-3: Considerations for Drug Design Using Mechanism-Based Sirtuin Inhibition. *ACS Med Chem Lett.* 2020;11:1886–92. doi:10.1021/acsmchemlett.9b00580.
116. Spiegelman NA, Hong JY, Hu J, Jing H, Wang M, Price IR, et al. A Small-Molecule SIRT2 Inhibitor That Promotes K-Ras4a Lysine Fatty-Acylation. *ChemMedChem.* 2019;14:744–8. doi:10.1002/cmdc.201800715.

6. Anhang

MTPR-Messungen

IC₅₀ Messungen SIRT5Abbildung S 1 IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-1 bis S5i-3

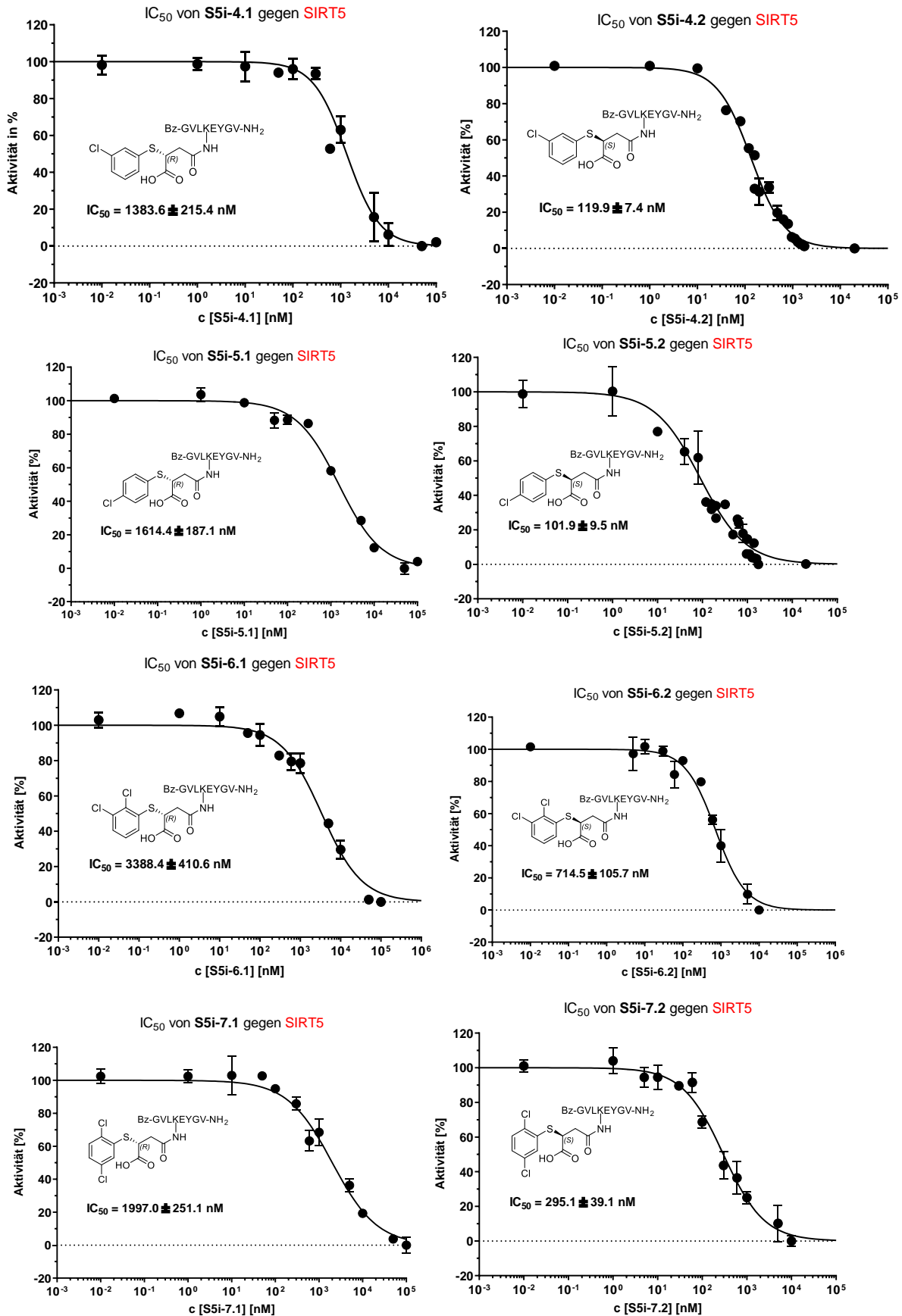


Abbildung S 2: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-4 bis S5i-7

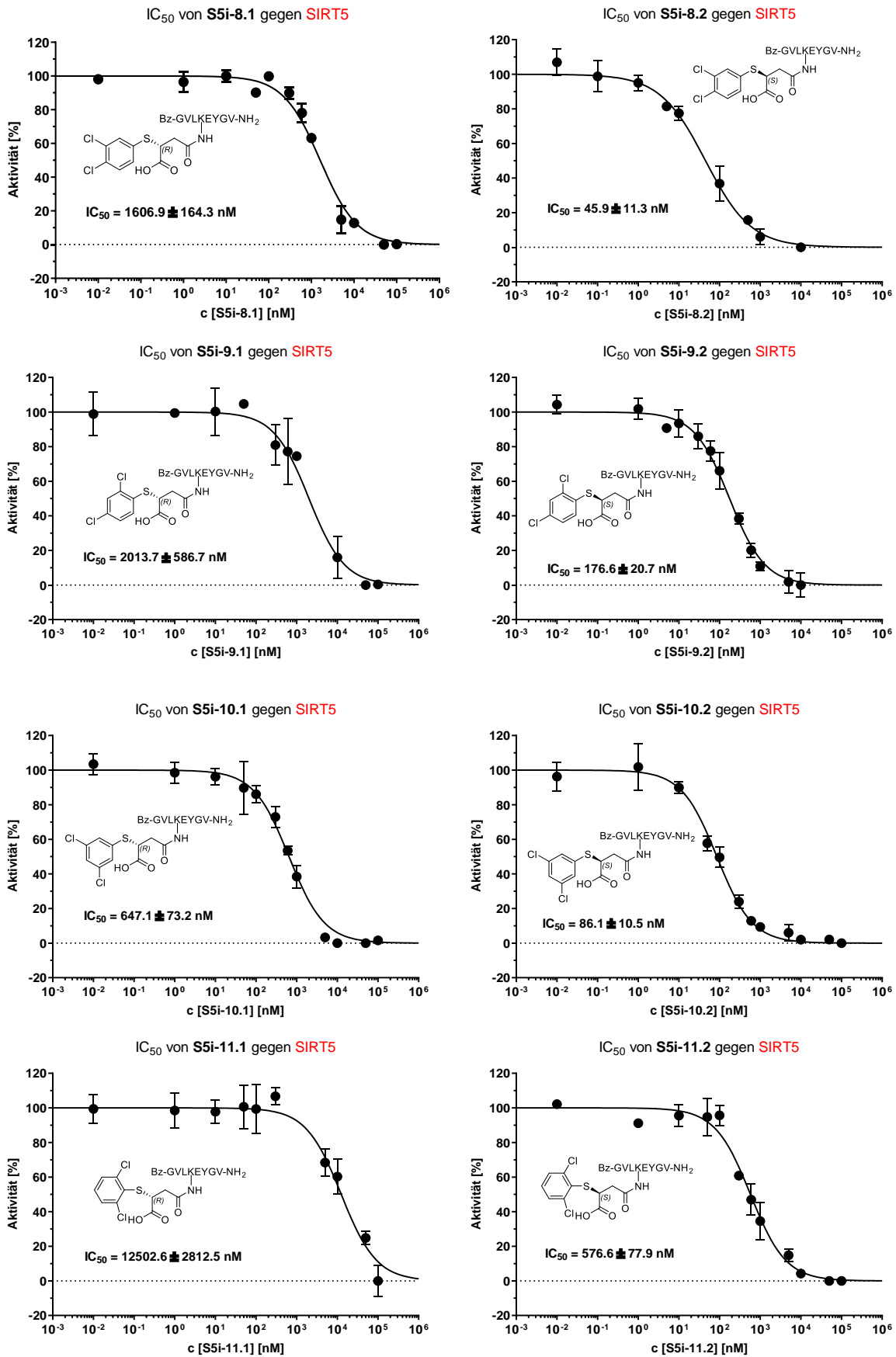
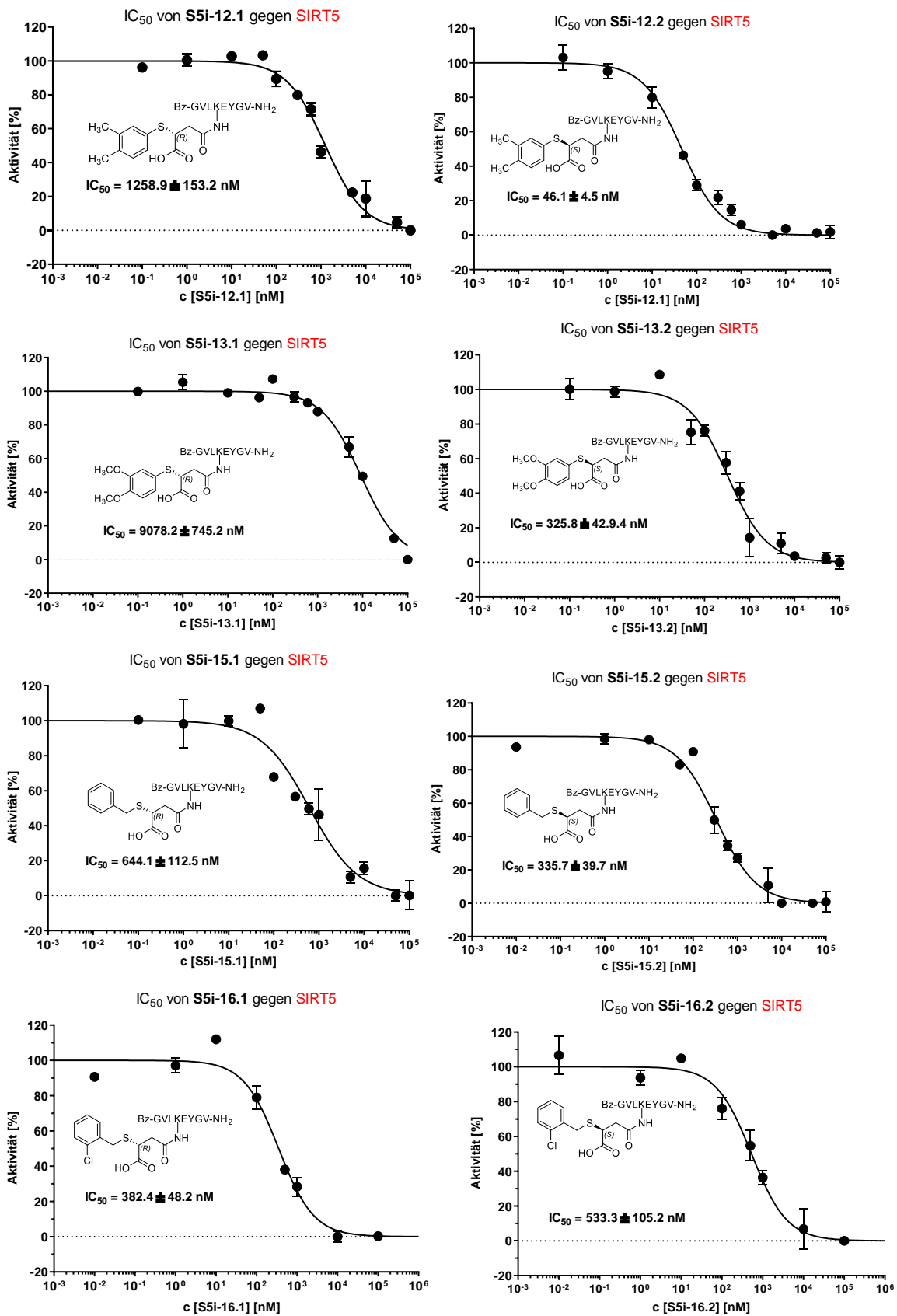
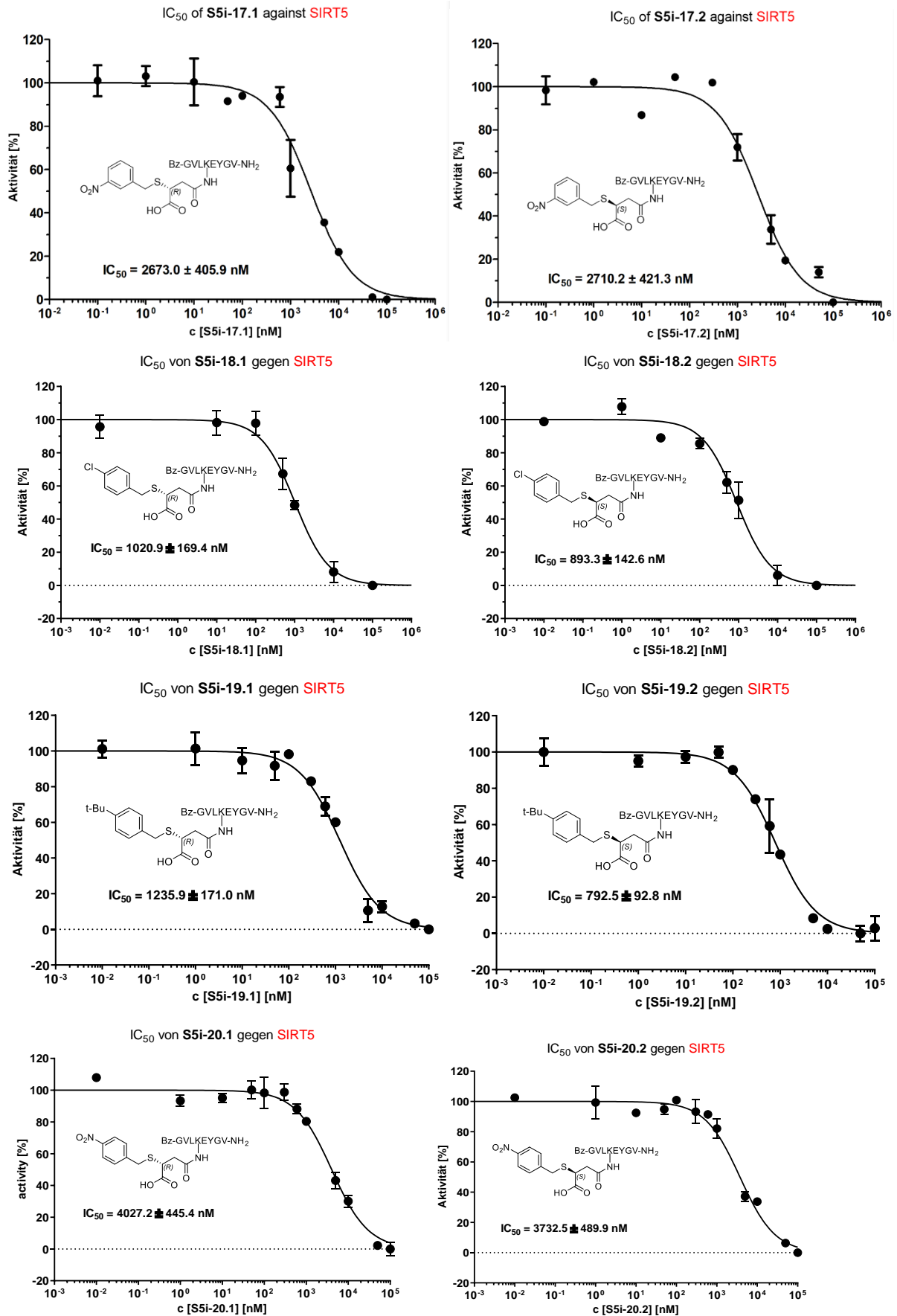


Abbildung S 3: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-8 bis S5i-11

Abbildung S 4: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-12 bis S5i-16

Abbildung S 5: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-17 bis S5i-20

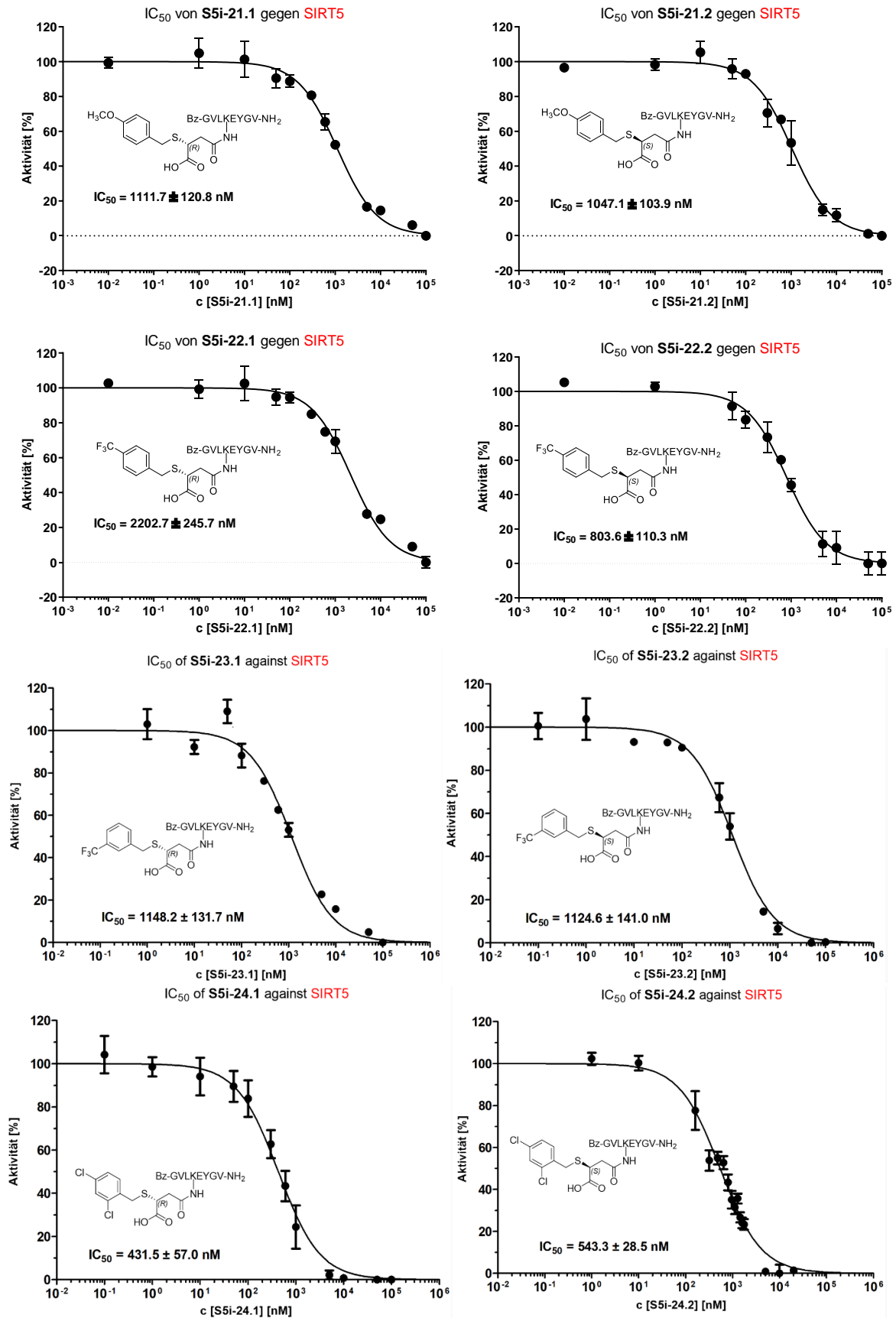
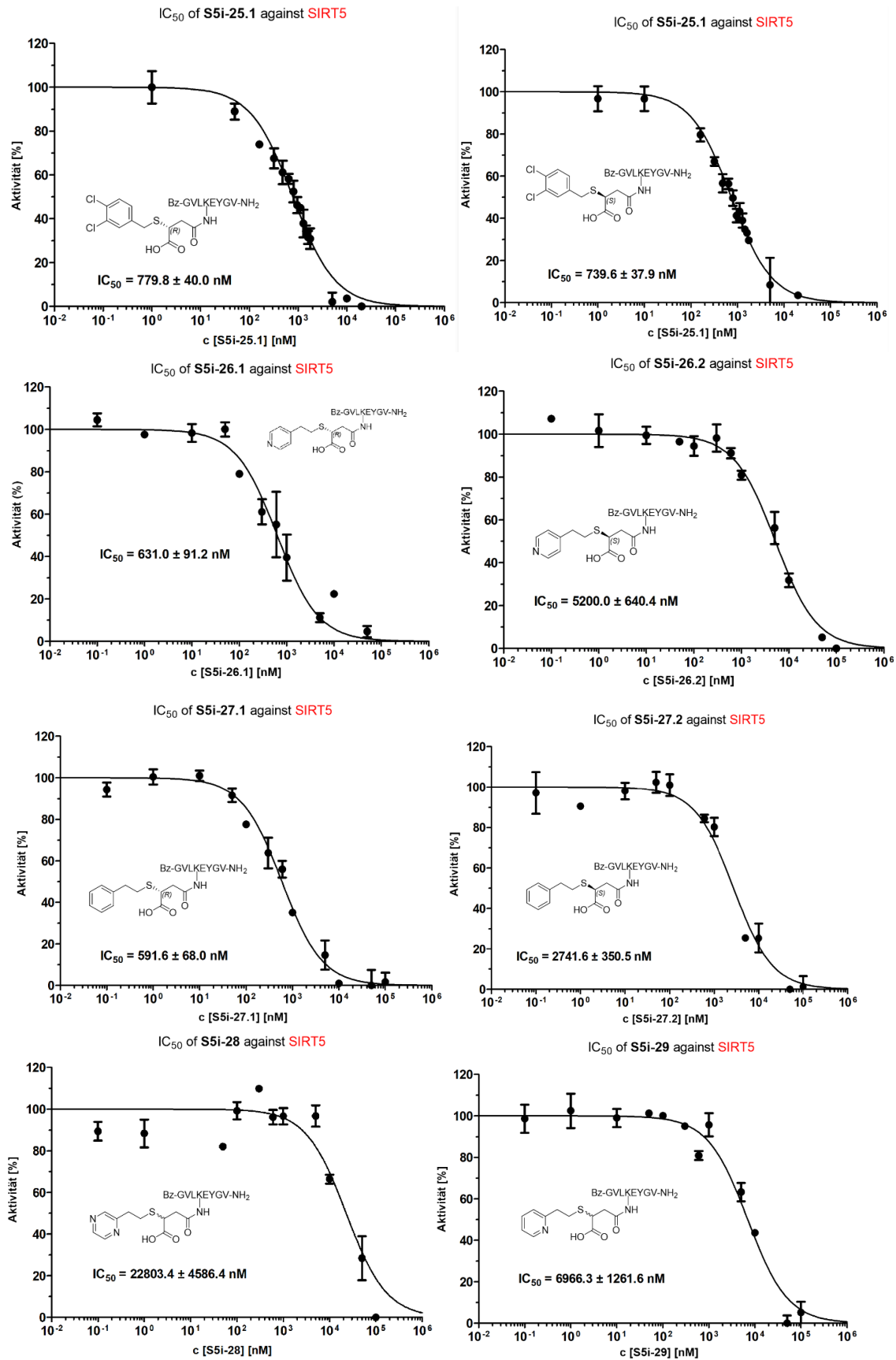
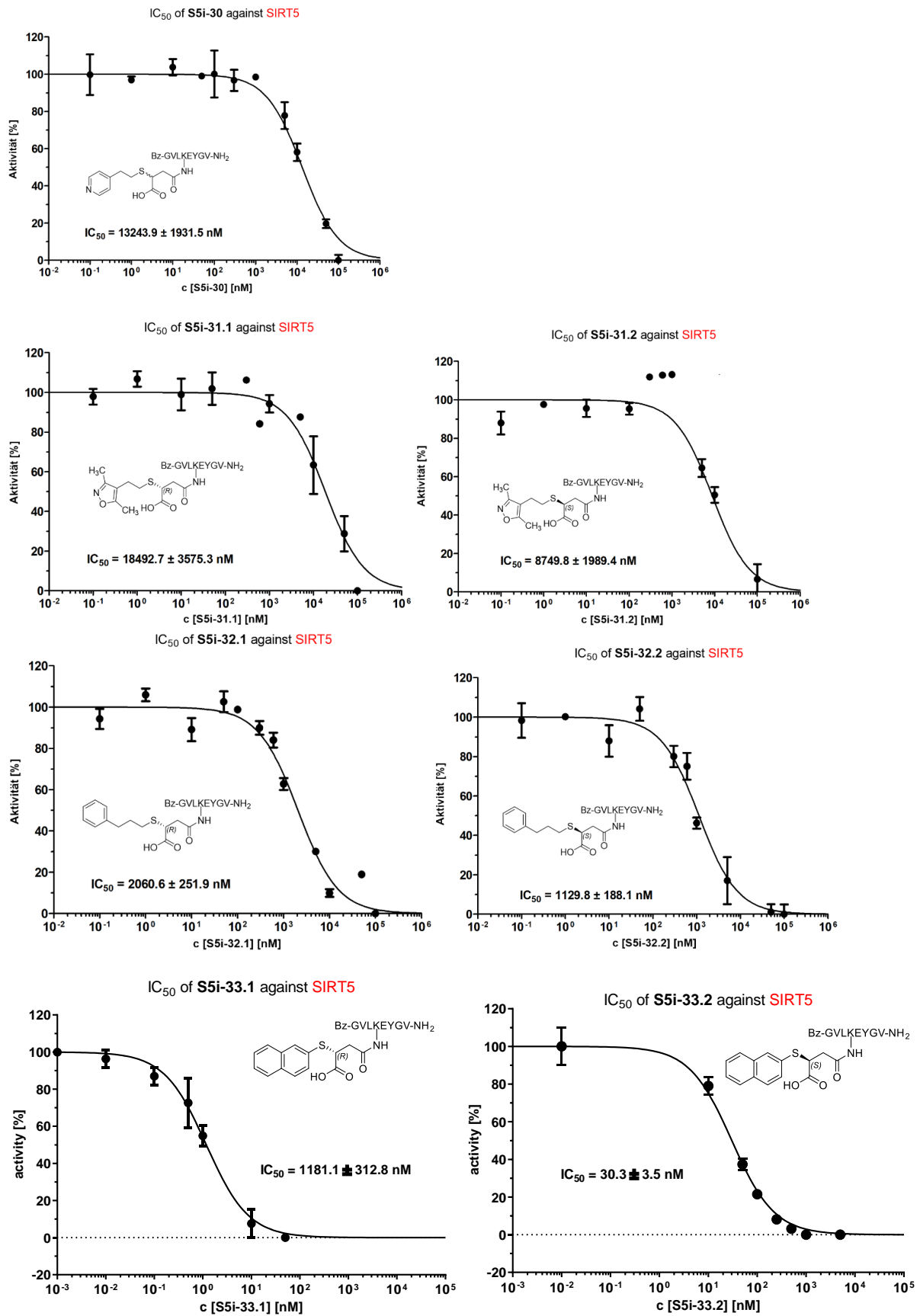
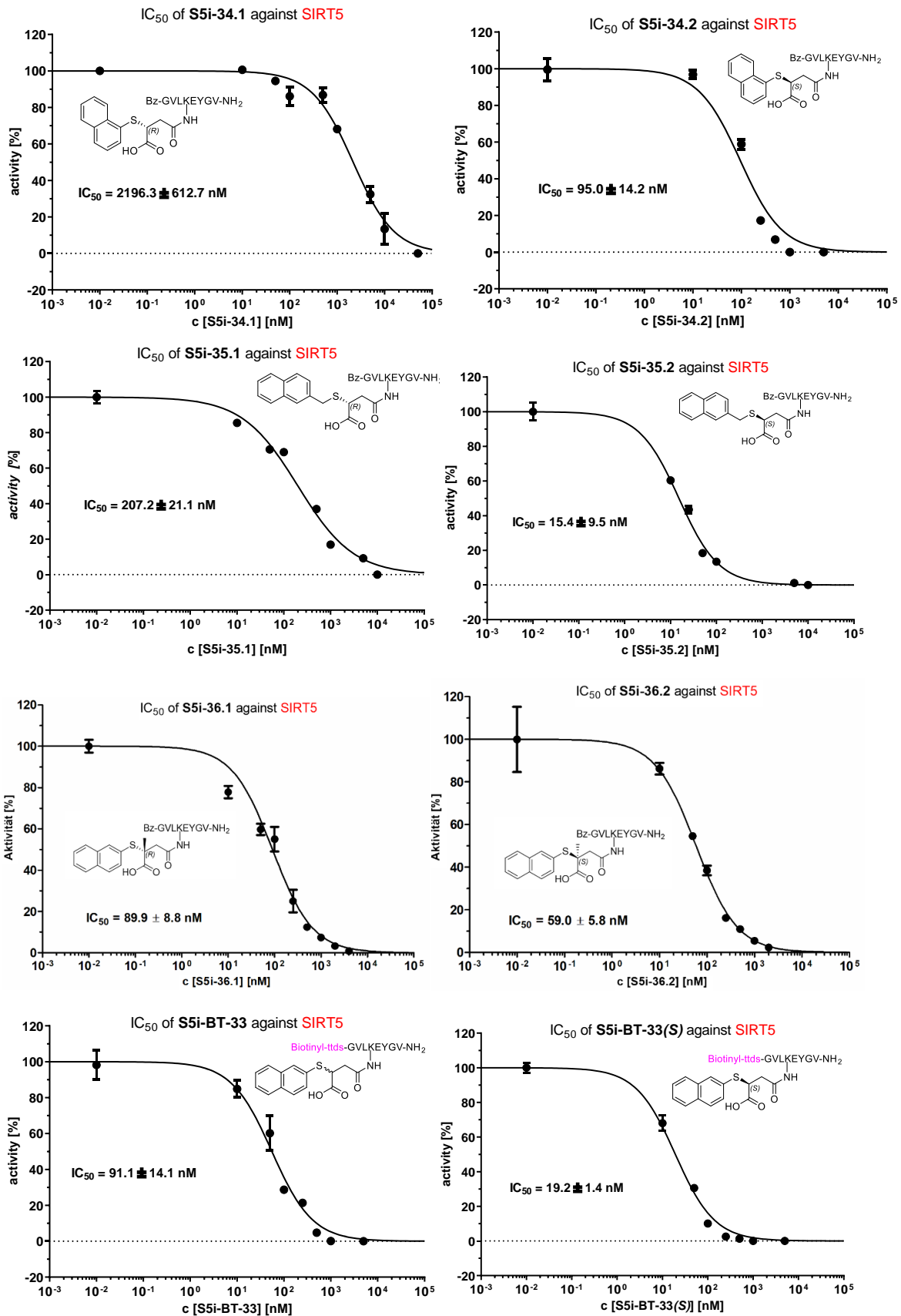
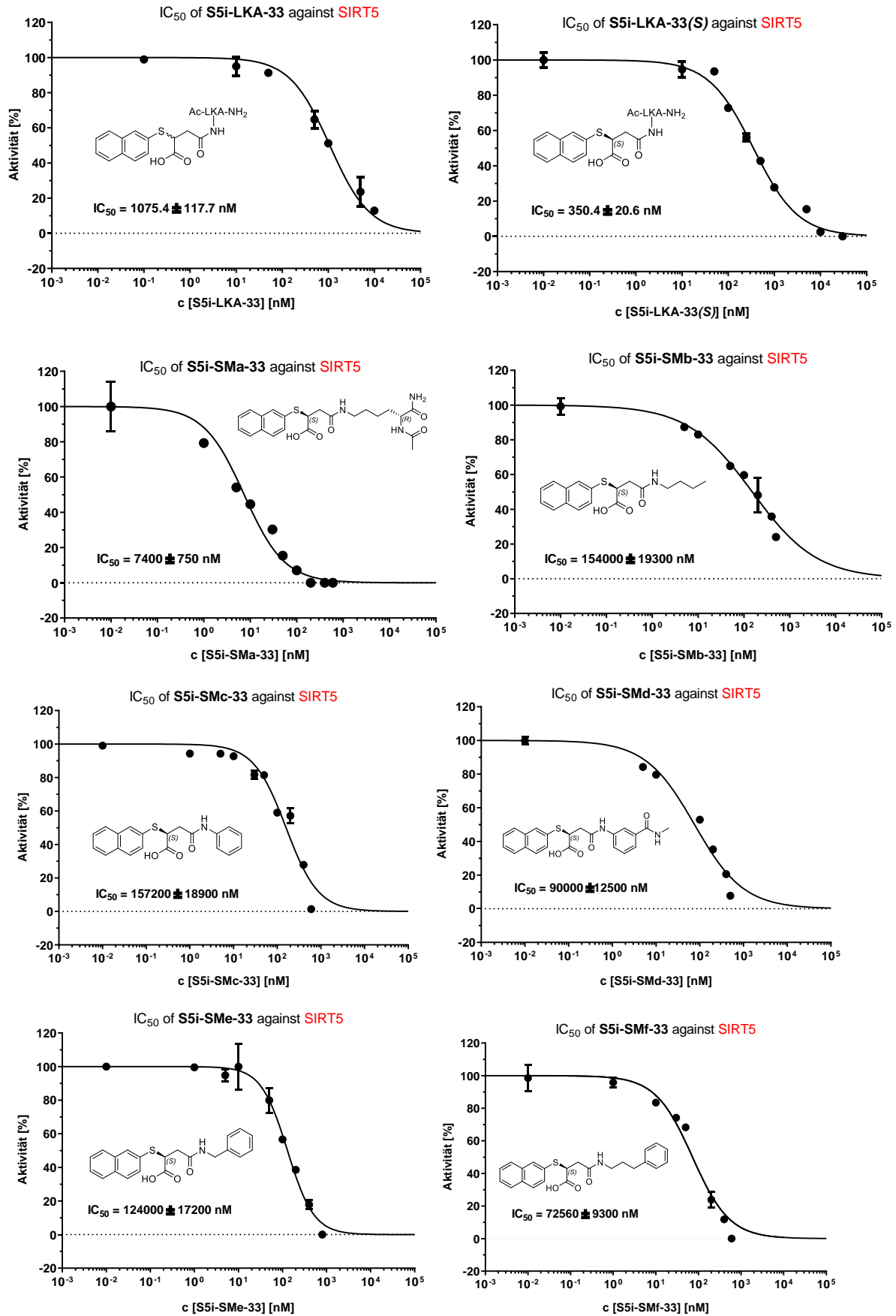


Abbildung S 6: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-21 bis S5i-24

Abbildung S 7: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-25 bis S5i-29

Abbildung S 8: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-30 bis S5i-33

Abbildung S 9: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-34 bis S5i-36 und S5i-BT-33

Abbildung S 10: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S5i-LKA-33 und S5i-SMa-33 bis S5i-Smf-33

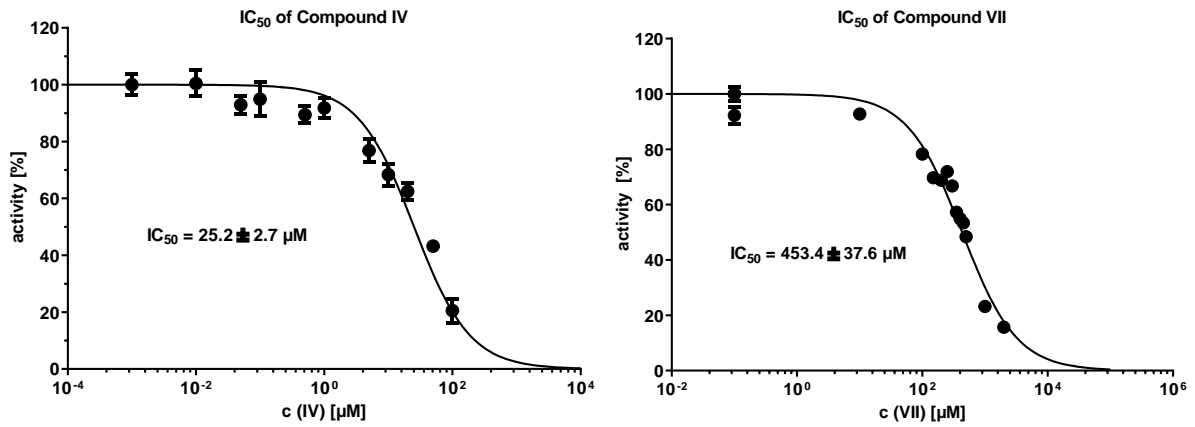


Abbildung S 11: IC₅₀ Kurven von *Compound IV* und *Compound VII*

K_i Messungen SIRT5

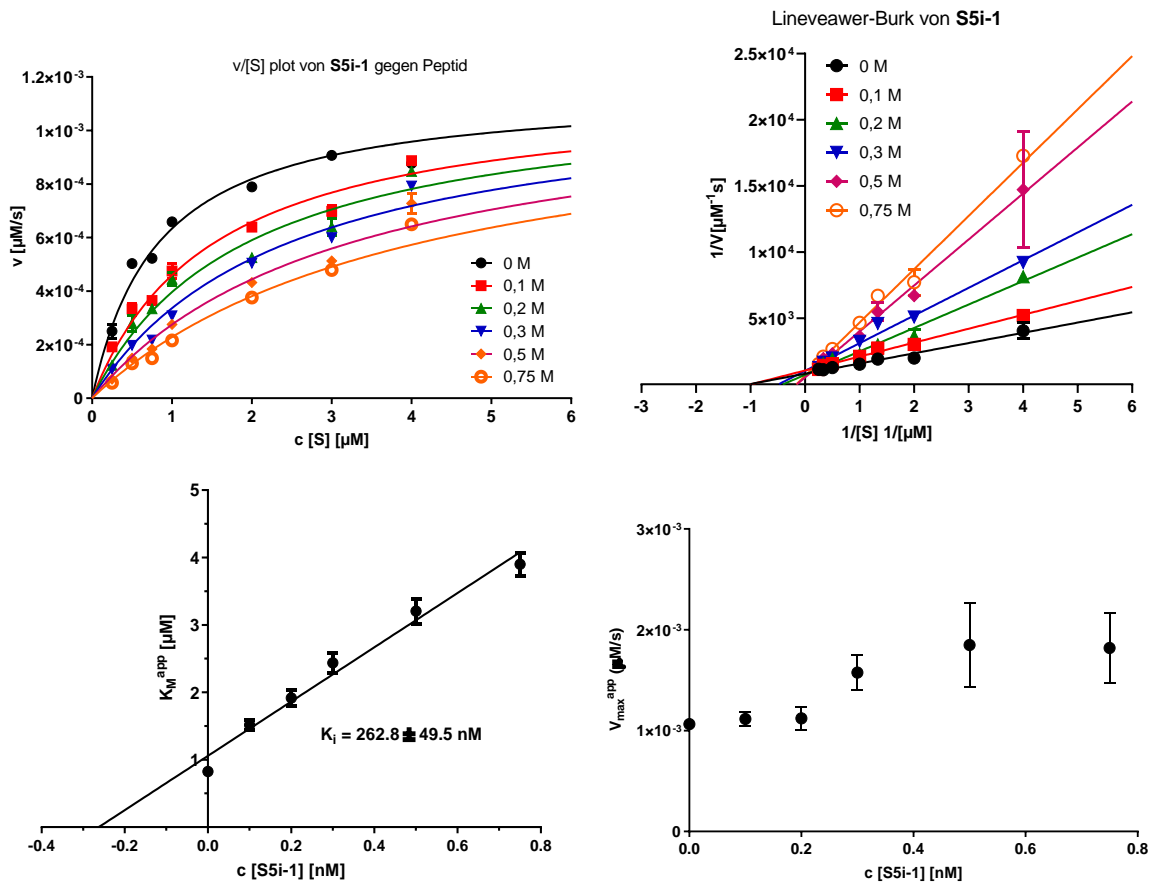


Abbildung S 12: v/[S]-Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-1 gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

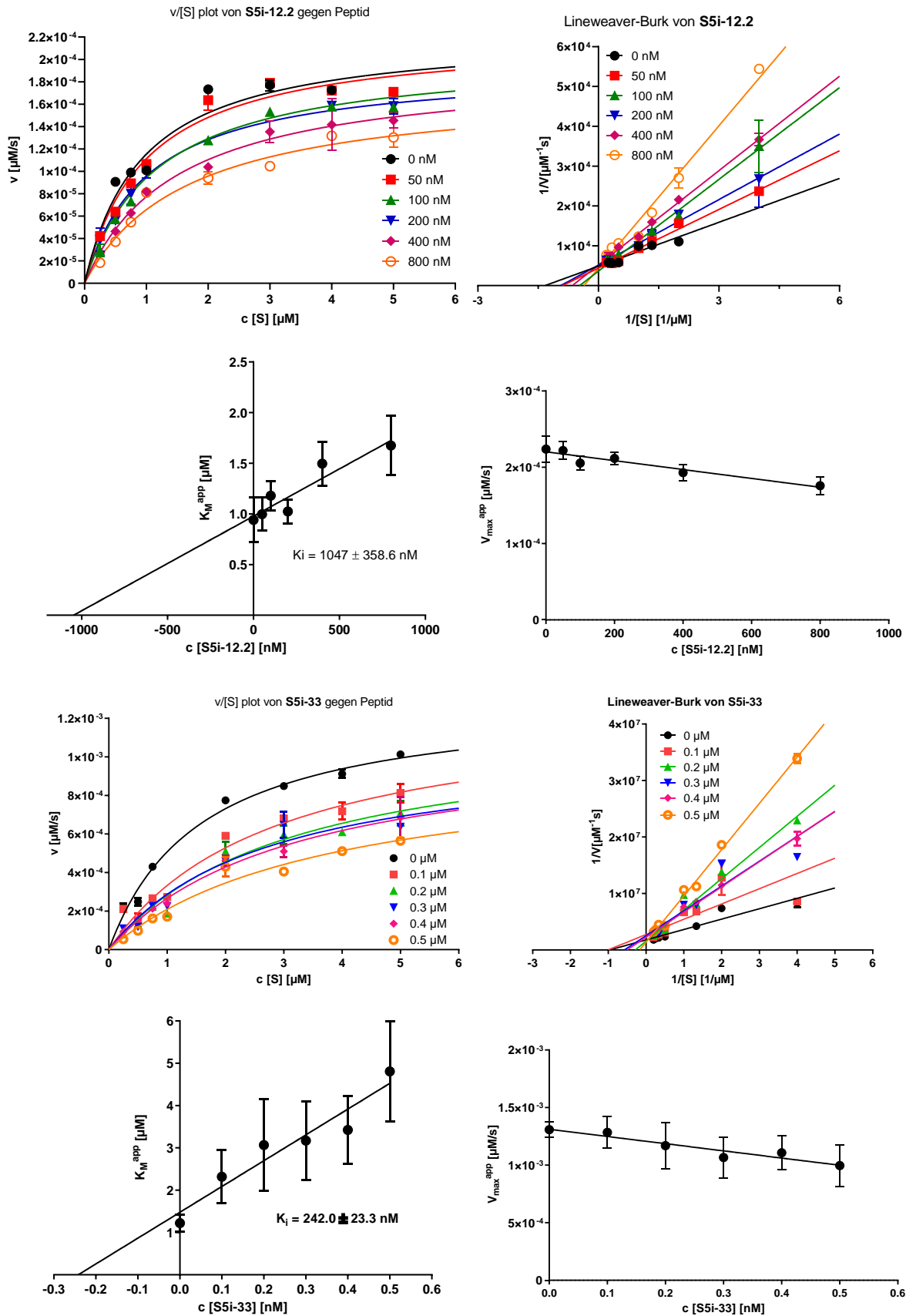


Abbildung S 13: v /[S]-Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-12 (Oben) und S5i-33 (Unten) gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

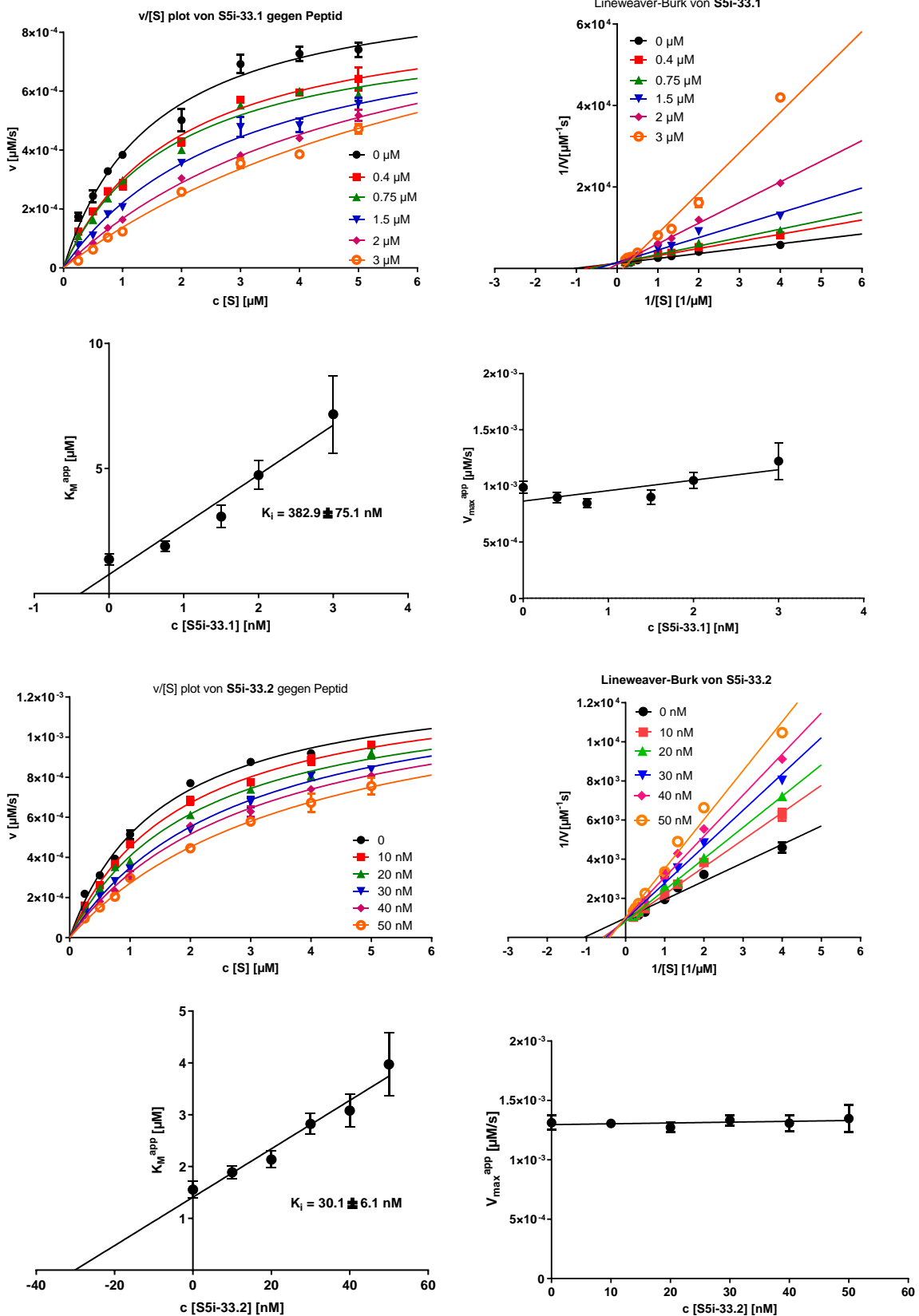


Abbildung S 14: v/[S]-Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-33.1 (Oben) und S5i-33.2 (Unten) gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

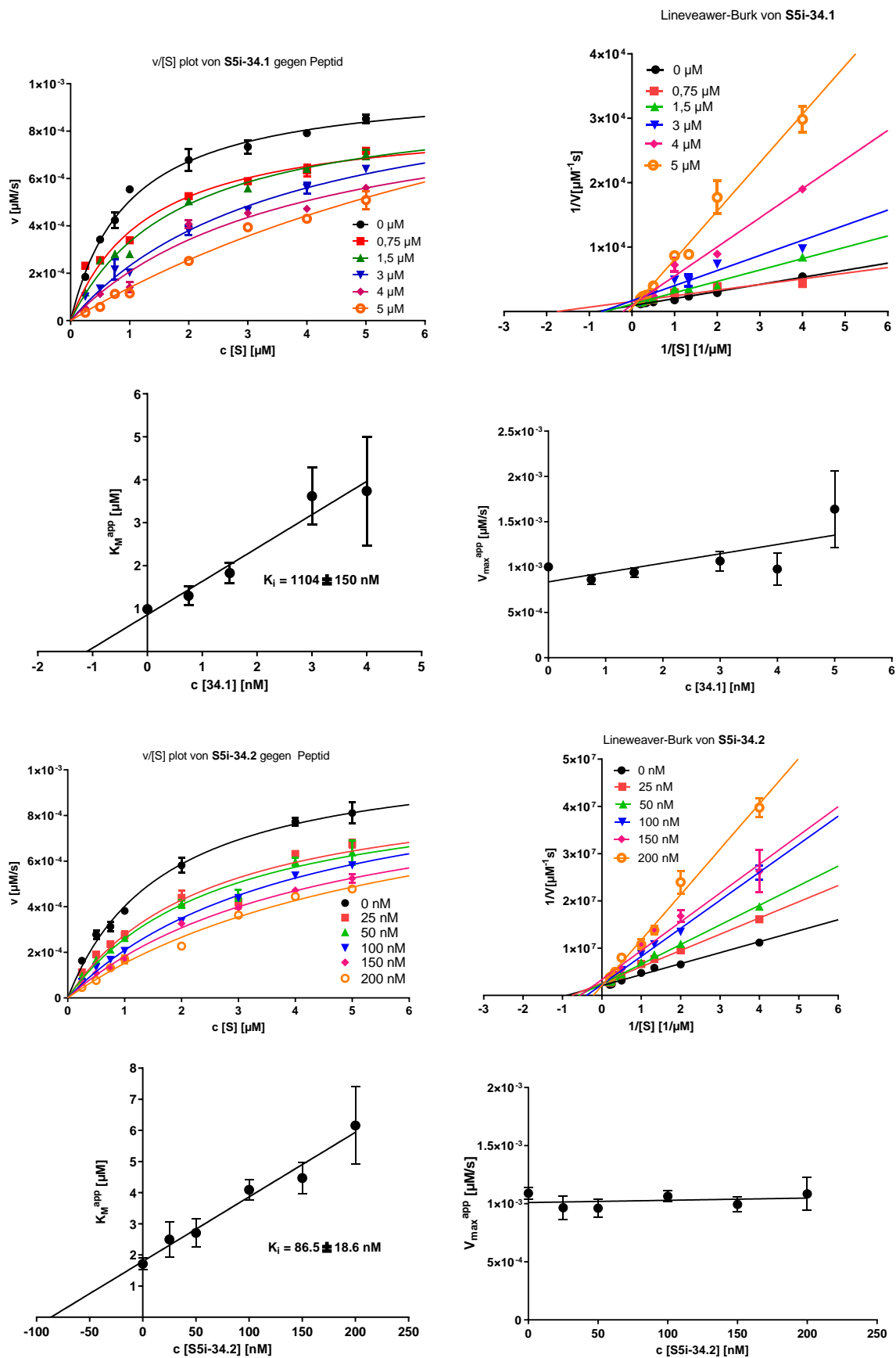


Abbildung S 15: v/[S]-Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-34.1 (Oben) und S5i-34.2 (Unten) gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

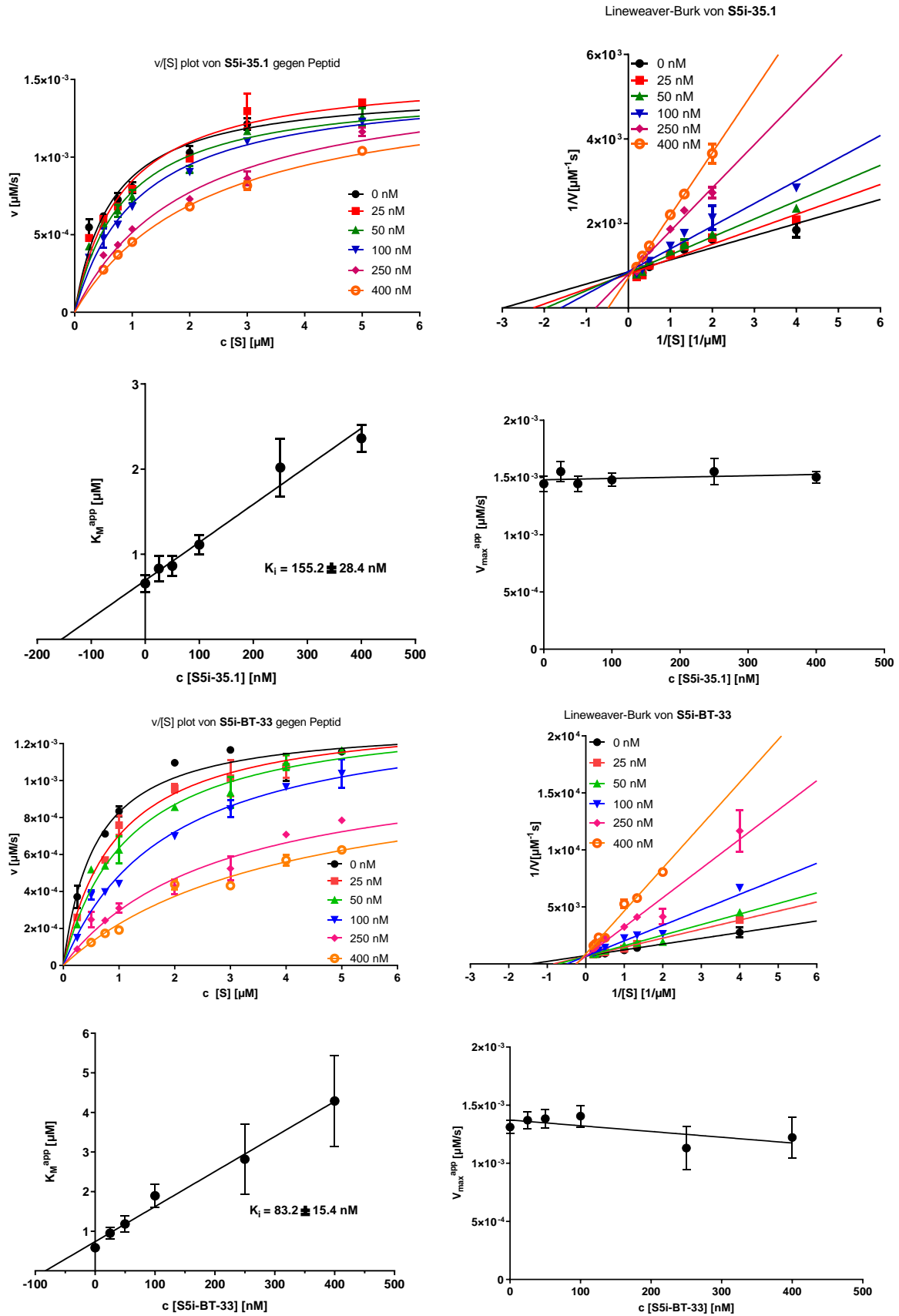


Abbildung S 16: v/[S]-Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-35.1 (Oben) und S5i-BT-33 (Unten) gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

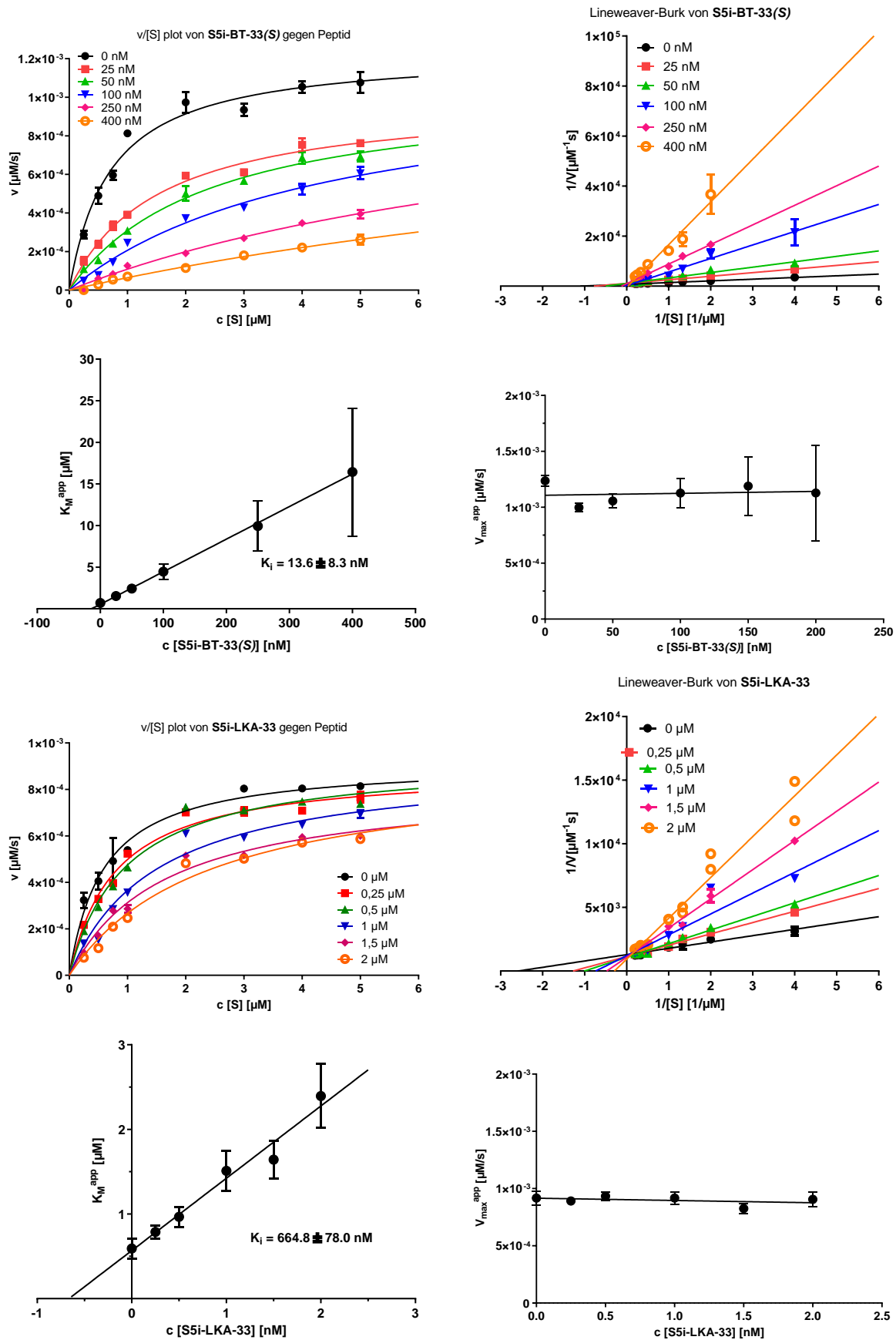


Abbildung S 17: $v/[S]$ -Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-BT-33(S) (oben) und S5i-LKA-33 (unten) gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

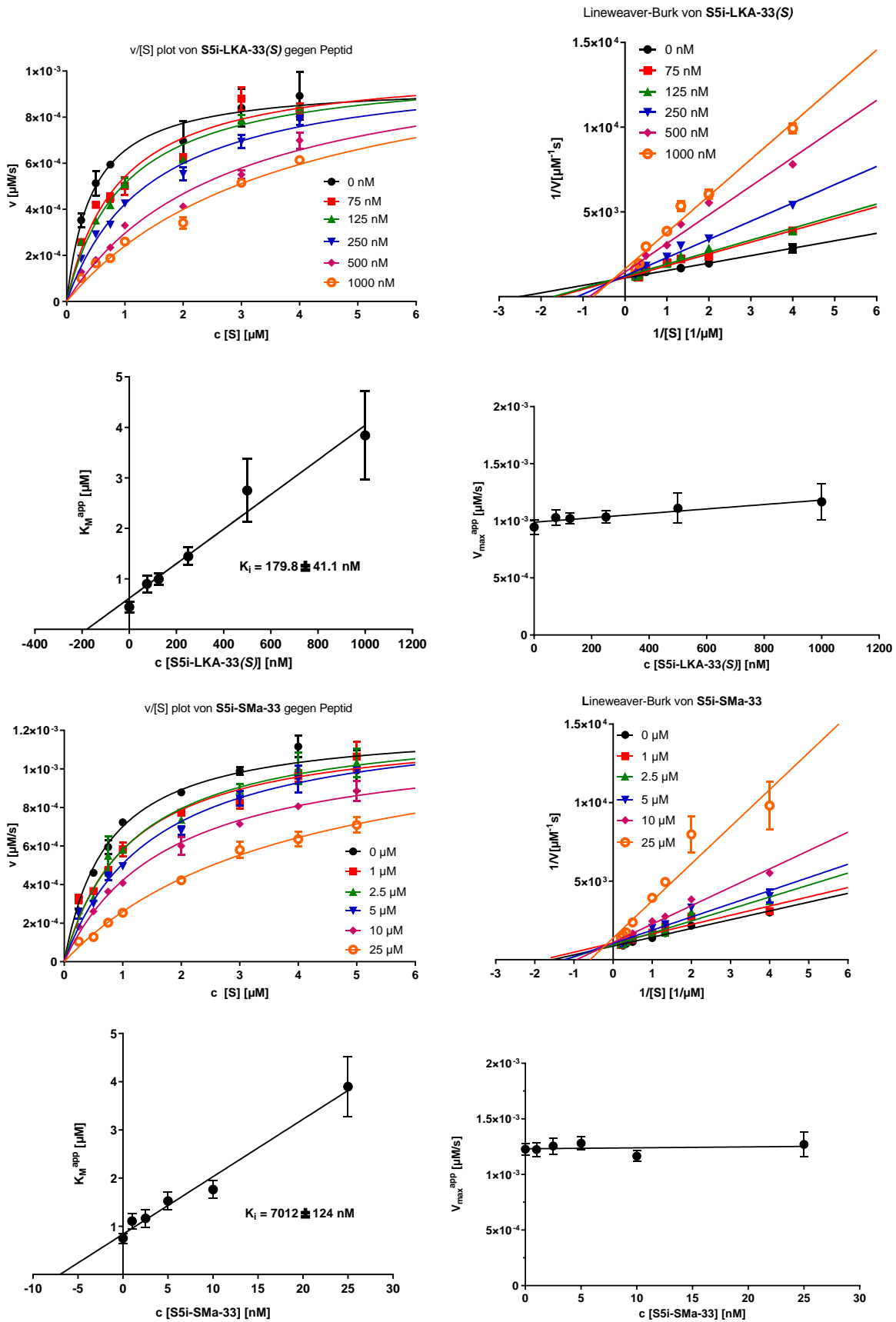


Abbildung S 18: v/[S]-Plot, Lineweaver-Burk und tertiär-plots des Inhibitors S5i-LKA-33(S) (oben) und S5i-SMa-33 (unten) gegen Peptid. Die Daten zeigen eine kompetitive Inhibition gegen SIRT5

IC₅₀ Messungen SIRT2**Tabelle S 1:** Überblick über die IC₅₀ und K_i Werte, gemessen mit MTPR Fluoreszenz assay

| | IC ₅₀ [NM] | K _i GEGEN PEPTID [NM] | K _i AND K _i ' GEGEN NAD ⁺ [NM] | INHIBITION TYP GEGEN NAD ⁺ |
|-----------|-----------------------|-------------------------------------|--|--|
| S2IL5 | 42.1 ± 7.9 | 10.5* | | n.d. |
| S5I-8 | Löslichkeitsprobleme | | | n.d. |
| S2I-A | 201.2 ± 23.9 | 65.9 ± 20.6 | | n.d. |
| S2I-B | 2206 ± 475.1 | 551.5* | | n.d. |
| S2I-C | 405.3 ± 70.1 | 216.6 ± 17.4 | | n.d. |
| S2I-D | 213.8 ± 18.2 | 53.4* | | n.d. |
| S2I-E | > 10000 | > 2500* | | n.d. |
| S2I-F | 5570 ± 381.8 | 1393* | | n.d. |
| S2I-G | 1330 ± 128.5 | 332.5* | | n.d. |
| S2I-H | > 10000 | > 2500* | | n.d. |
| S2I-1 | 452.7 ± 38.9 | 178.9 ± 44.1 | K _i = 2235 ± 141.5 K _i ' = 3175 ± 141.5 | Partial nicht- Kompetitiv |
| S2I-1(S) | 211.3 ± 20.9 | 108.9 ± 29.4 | | n.d. |
| S2I-2 | 294.5 ± 26.6 | 73.6* | | n.d. |
| S2I-3 | 291.1 ± 18.7 | 73.0* | | n.d. |
| S2I-4 | 1173 ± 127.6 | 293.3* | | n.d. |
| S2I-5 | 4305 ± 298.1 | 1076* | | n.d. |
| S2I-6 | 129.2 ± 10.1 | 106.5 ± 26.2 | K _i = 843.0 ± 216.4 K _i ' = 1415 ± 356.4 | Partial nicht- Kompetitiv |
| S2I-7 | 1315 ± 207.1 | 328.7* | | n.d. |
| S2I-8 | 163.2 ± 33.7 | 41.0* | | n.d. |
| S2I-9 | 256.3 ± 33.0 | 64.0* | | n.d. |
| S2I-10 | 150.0 ± 12.2 | 62.8 ± 11.9 | K _i = 1184 ± 216.8 K _i ' = 3143 ± 160.7 | Partial nicht- Kompetitiv |
| S2I-11 | 233.2 ± 22.7 | 60.5 ± 15.2 | K _i = 267.0 ± 35.7 K _i ' = 416.6 ± 92.3 | Partial nicht- Kompetitiv |
| S2I-12 | 1397 ± 100.2 | 537.6 ± 141.8 | K _i = 1332 ± 535.1 | Kompetitiv |
| S2I-13 | 4800 ± 690 | 543.3 ± 203.0 | K _i = 2740 ± 920.7 | Kompetitiv |
| S2I-14 | 178.2 ± 26.0 | 154.3 ± 37.2 | K _i = 95.7 ± 16.1 | Kompetitiv |
| S2I-KK-1 | 2278 ± 328.4 | 1377 ± 317.1 | | n.d. |
| S2I-KT-1 | 1266 ± 41.6 | 316.5* | | n.d. |
| S2I-KK-14 | 7563 ± 1108 | 15690 ± 2661 | | n.d. |
| S2I-K-1 | 582.5 ± 64.97 | 2125 ± 260.3 | | n.d. |
| S2I-BT-1 | 595.1 ± 71.6 | 274.4 ± 42.6 | K _i = 858.4 ± 178.6 K _i ' = 2359 ± 567.4 | Partial nicht- Kompetitiv |
| S2I-BT-11 | 137.7 ± 18.5 | 34.5* | | n.d. |
| S2I-BT-12 | 486.4 ± 70.6 | 121.6* | | n.d. |
| S2I-CF-1 | 203.3 ± 24.5 | 116.3 ± 20.3 | K _i = 939.7 ± 138.3 K _i ' = 3436 ± 762.3 | Partial nicht- Kompetitiv |
| S2I-CF-12 | 54.3 ± 6.1 | 26.8 ± 6.7 | K _i = 177.7 ± 47.5 | Kompetitiv |
| S2I-CF-13 | 230.9 ± 8.9 | 70.1 ± 17.5 | | n.d. |

n.d. – nicht bestimmt

* K_i berechnet über die Cheng-prusoff gleichung

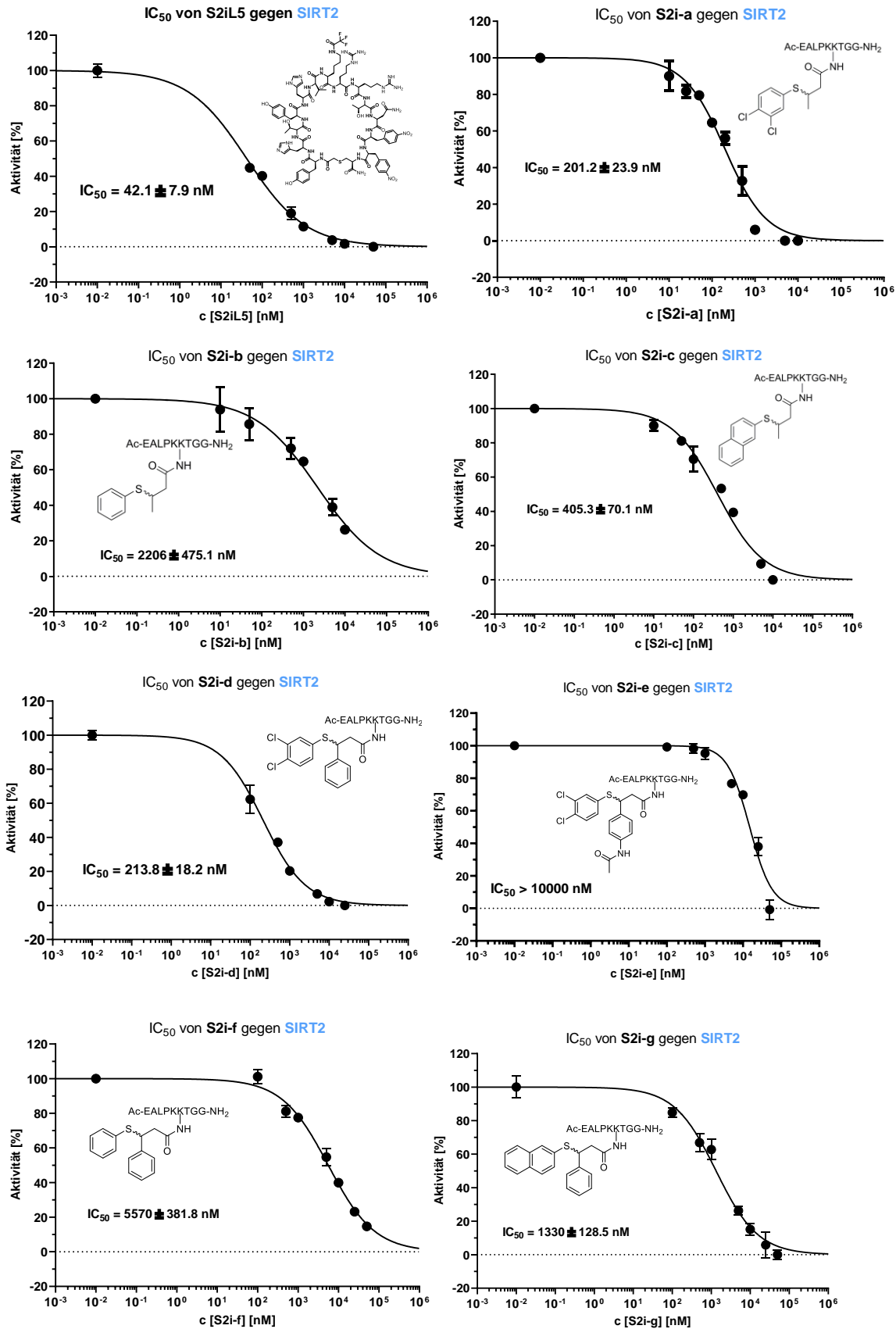


Abbildung S 19: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S2iL5, S2i-a bis S2i-g gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

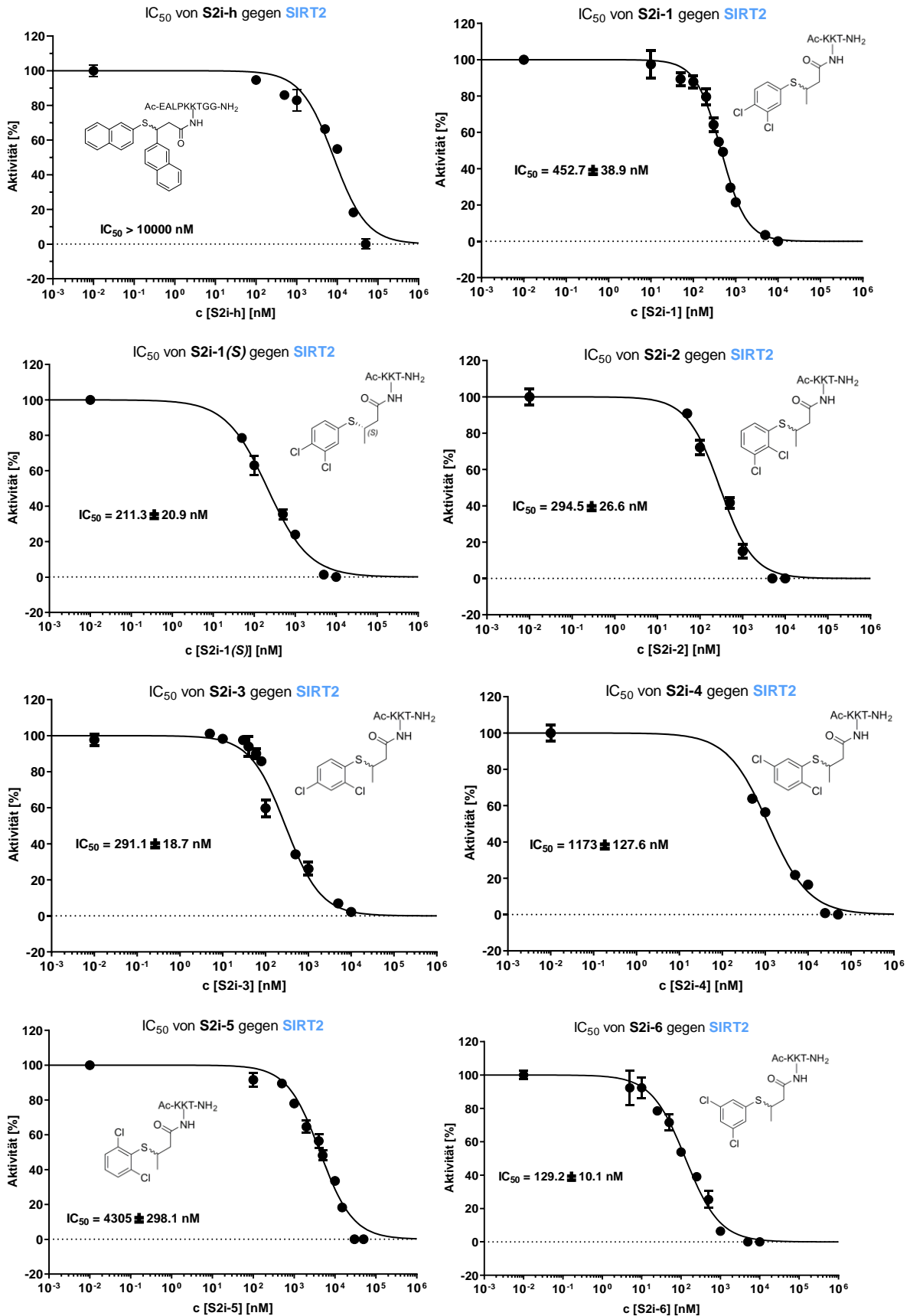
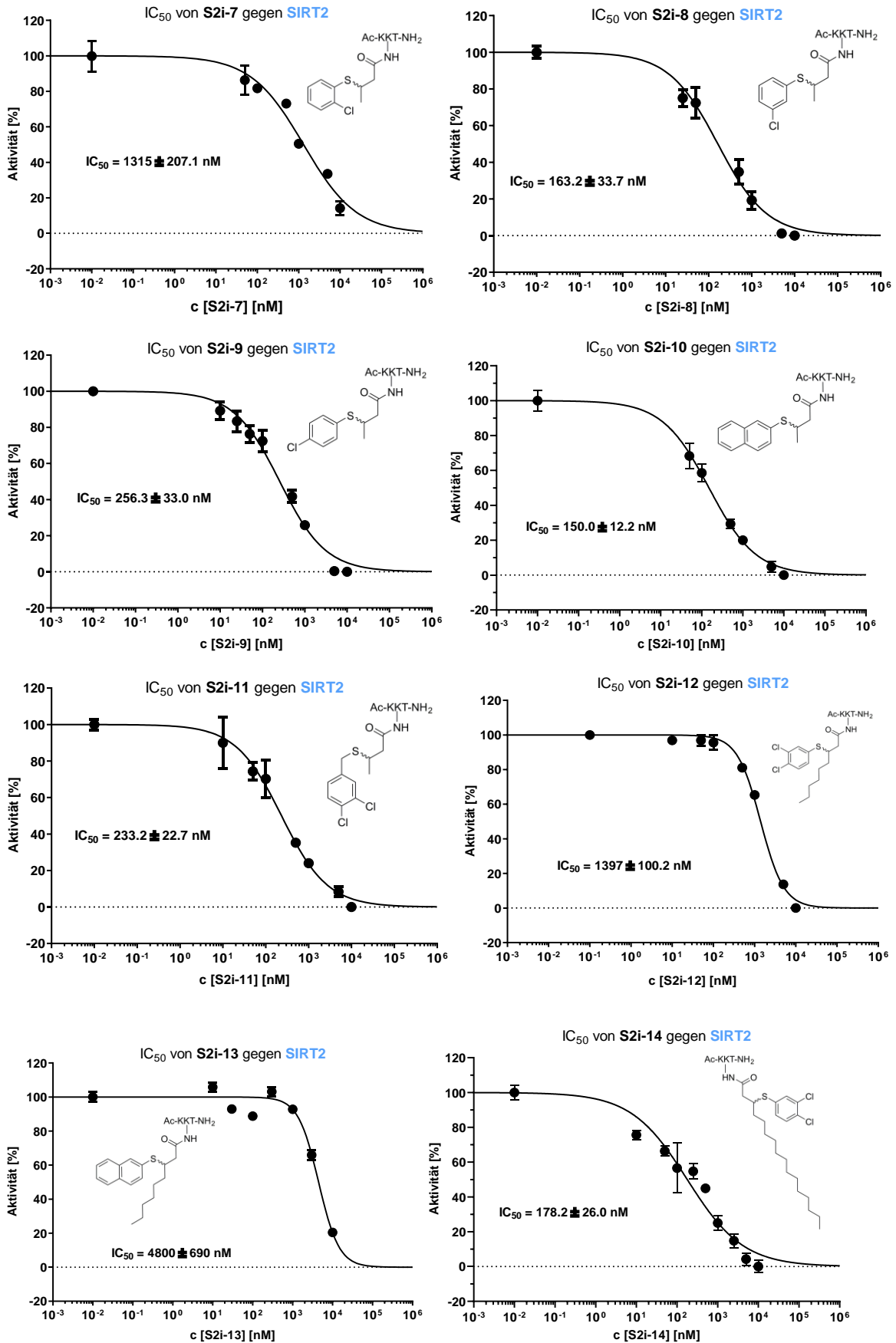


Abbildung S 20: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S2i-h und S2i-1 bis S2i-6 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

Abbildung S 21: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S2i-7 bis S2i-14 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

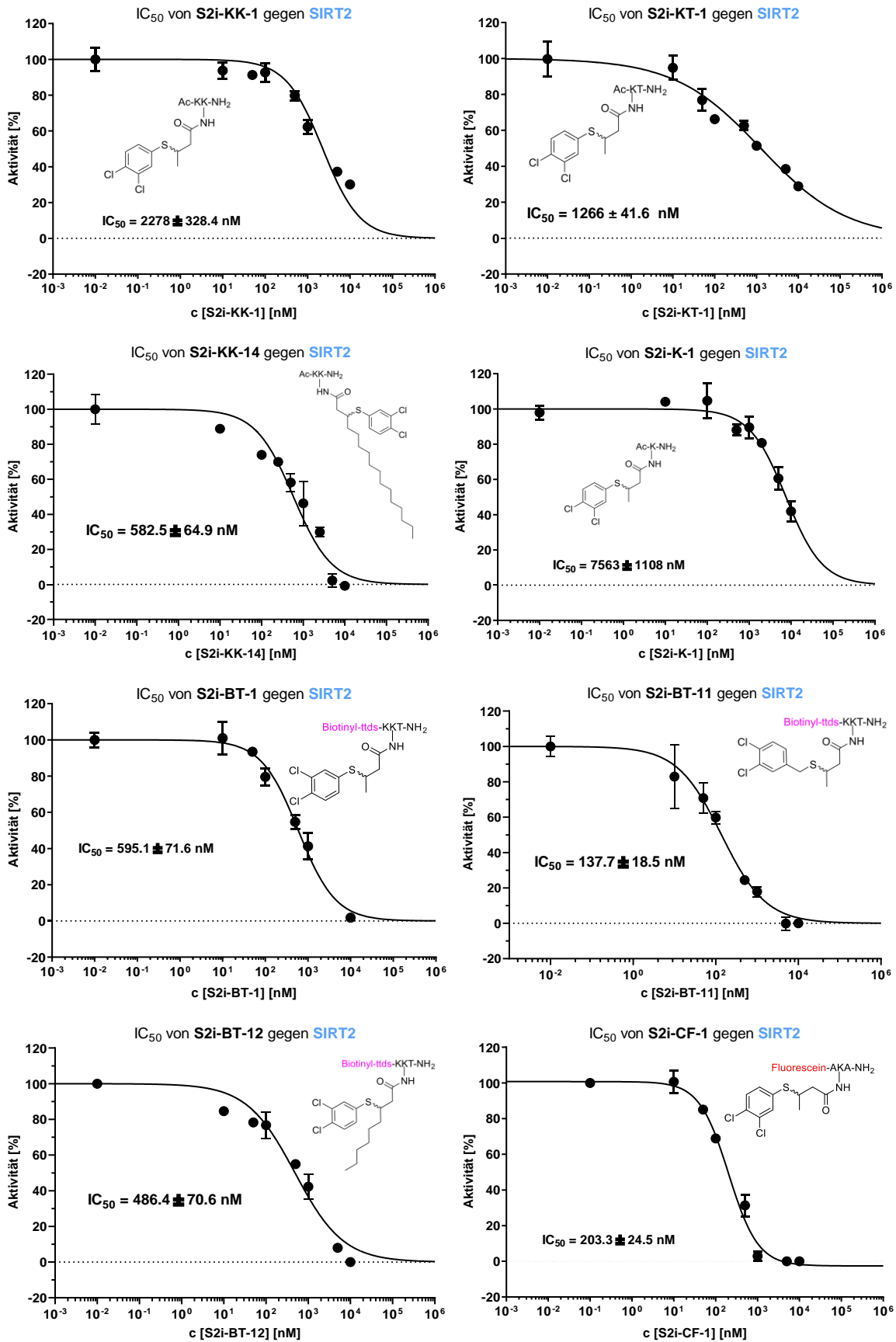


Abbildung S 22: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S2i-KK-1, S2i-KT-1, S2i-KK-14, S2i-K-1, S2i-BT-1, S2i-BT-11, S2i-BT-12 und S2i-CF-1 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

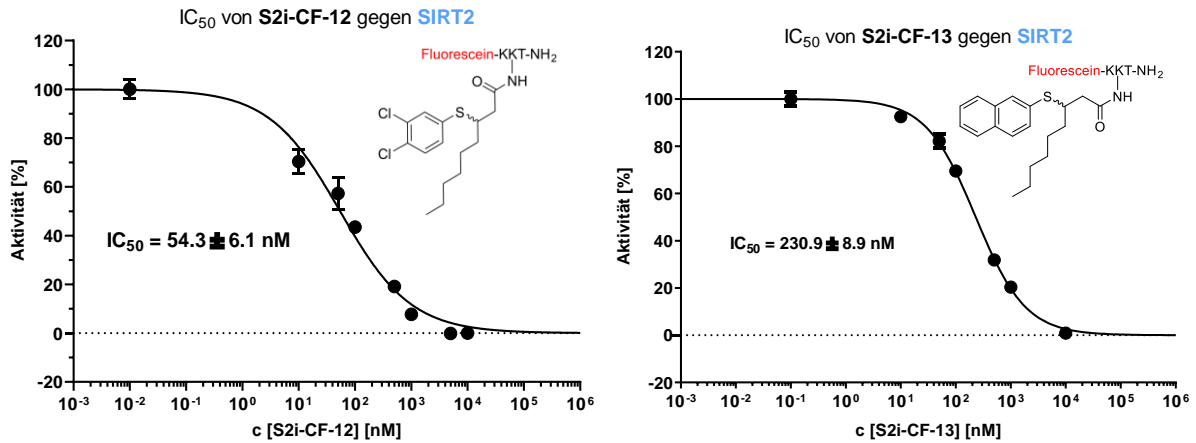
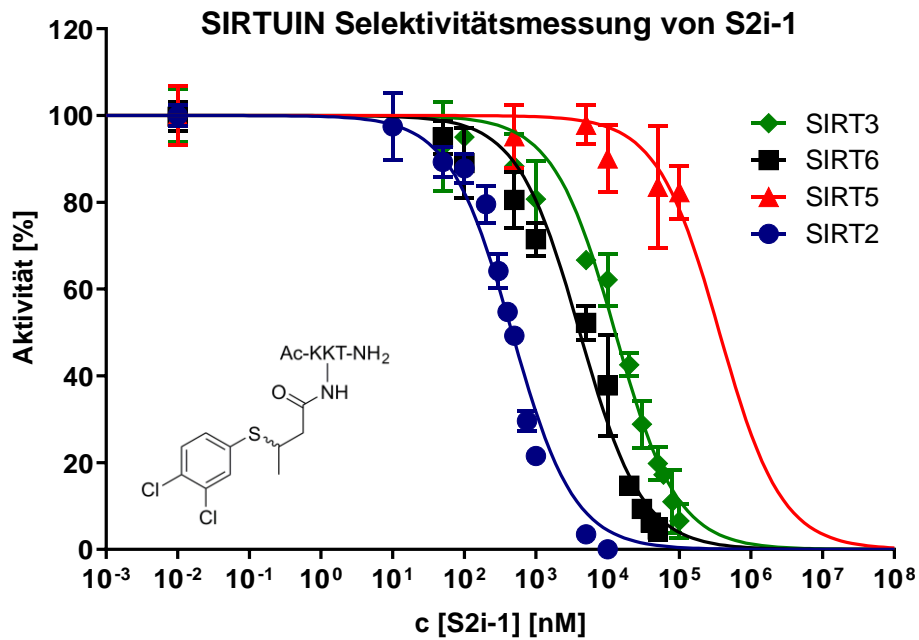


Abbildung S 23: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate und S2i-CF-12 und S2i-CF-13 gegen SIRT2, gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay



| | SIRT2 | SIRT3 | SIRT5 | SIRT6 |
|-----------------------|-------------|------------|-------|-------------|
| IC ₅₀ [μM] | 0.46 ± 0.04 | 12.7 ± 1.5 | > 350 | 4.16 ± 0.56 |

Abbildung S 24: Selektivitätsmessung von Peptid-Derivat S2i-1 gegen die SIRTUINE 2,3,5 und 6. Der IC₅₀-Wert gegen SIRT2 ist um ein 10-faches gegen SIRT6 und 20-faches potenter als SIRT3. Gegen SIRT5 konnte kein genauer IC₅₀ Wert ermittelt werden.

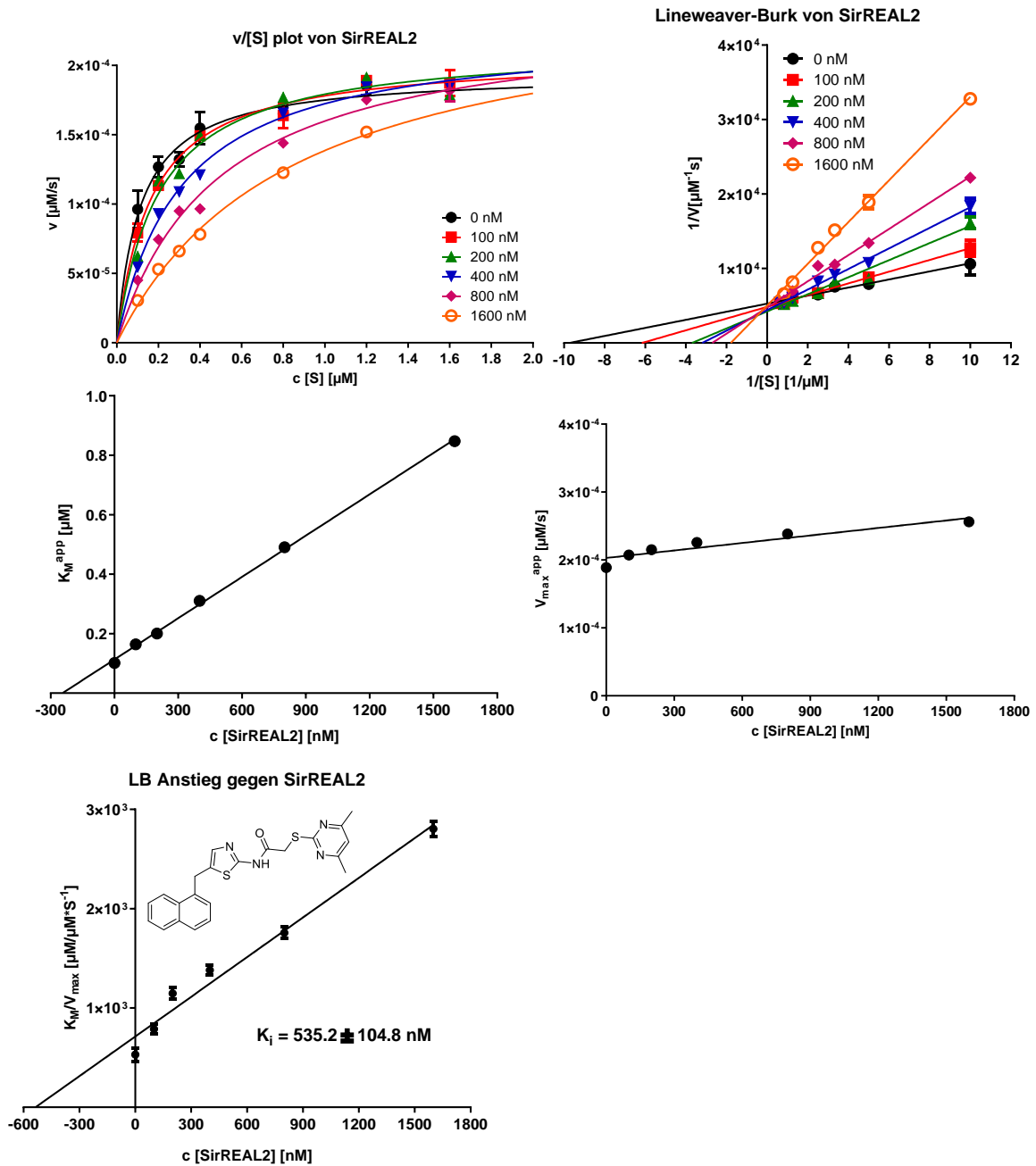
K_i Messungen SIRT2

Abbildung S 25: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von SirREAL2, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

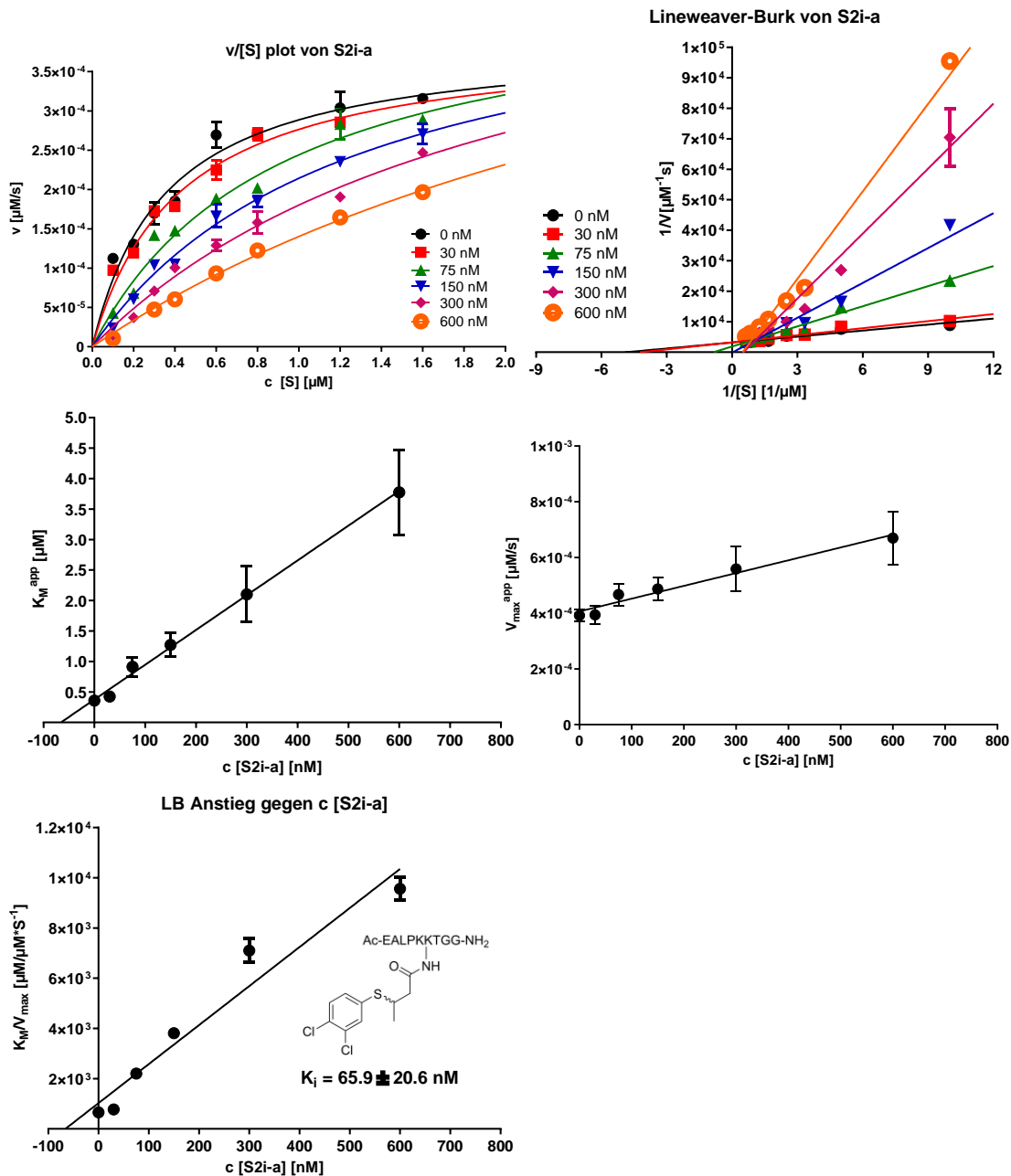


Abbildung S 26: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat **S2i-a**, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

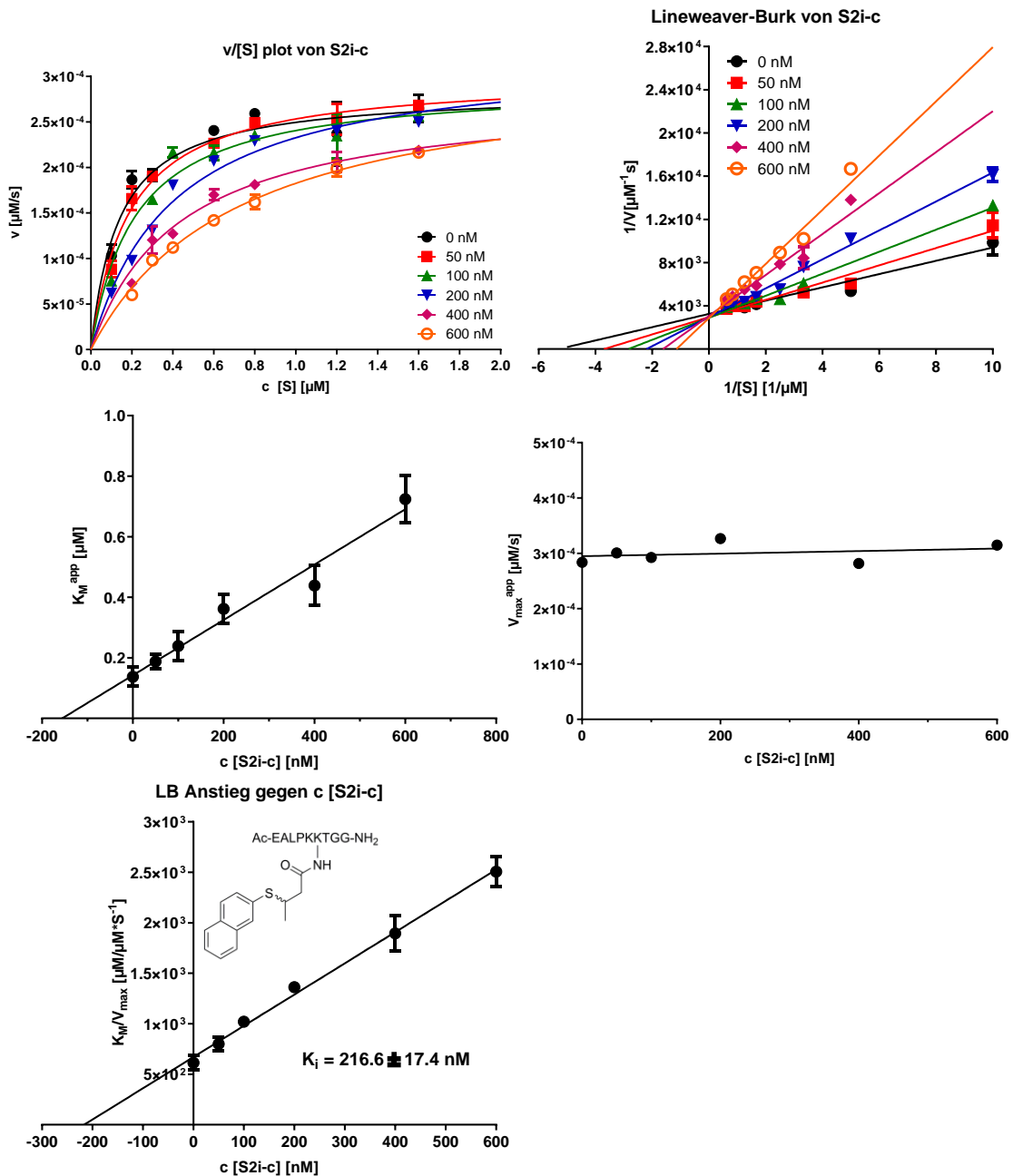


Abbildung S 27: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-c, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

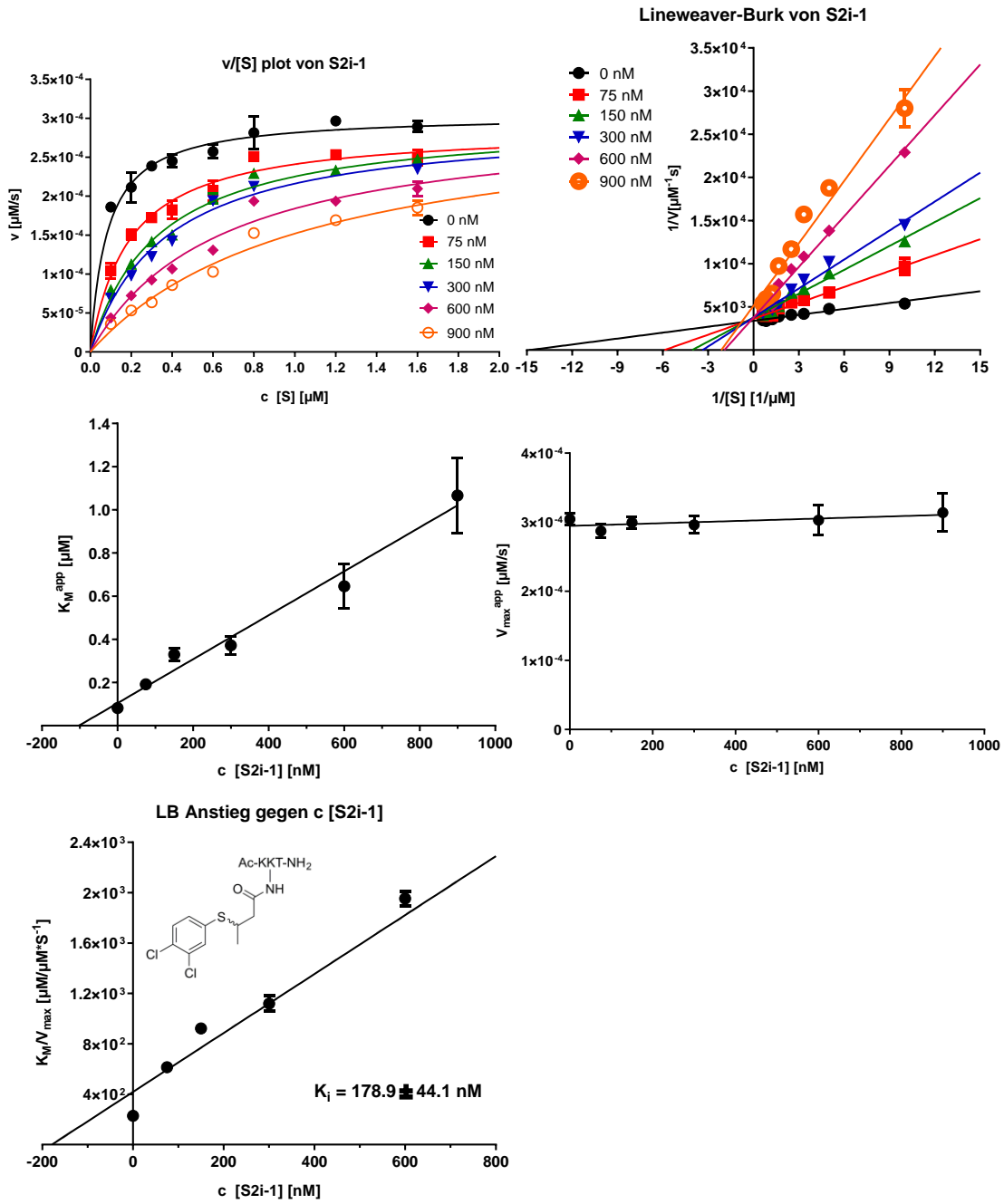


Abbildung S 28: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat **S2i-1**, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzyme-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

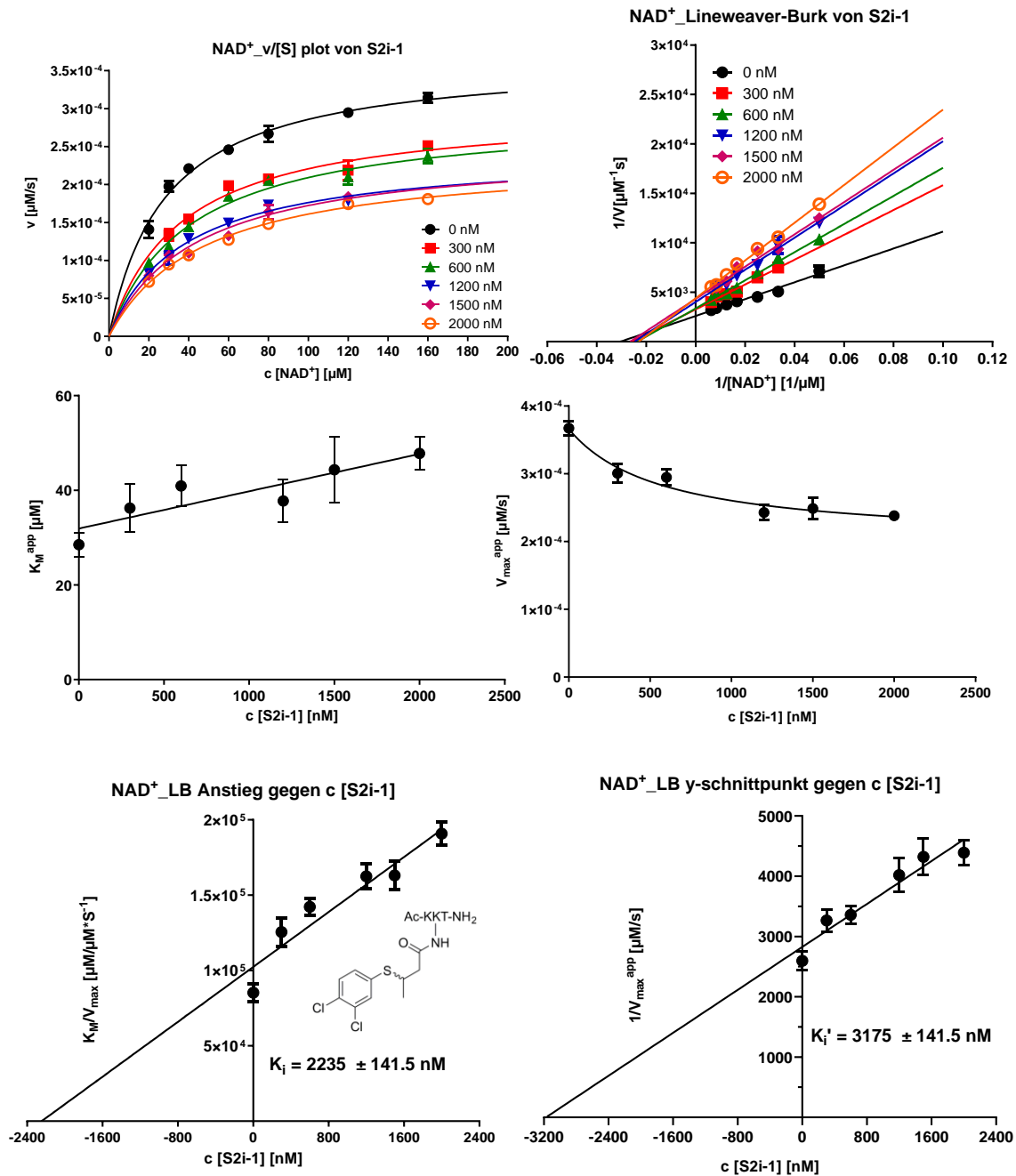


Abbildung S 29: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD⁺ von Peptid-Derivat **S2i-1** und zeigt eine partial nicht-Kompetitive Inhibition gegen NAD⁺. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_i' für den enzym-Inhibitor-substrat Komplex wurde aus dem Plot LB-Ordinatenschnittpunkt gegen c [Inhibitor] bestimmt.

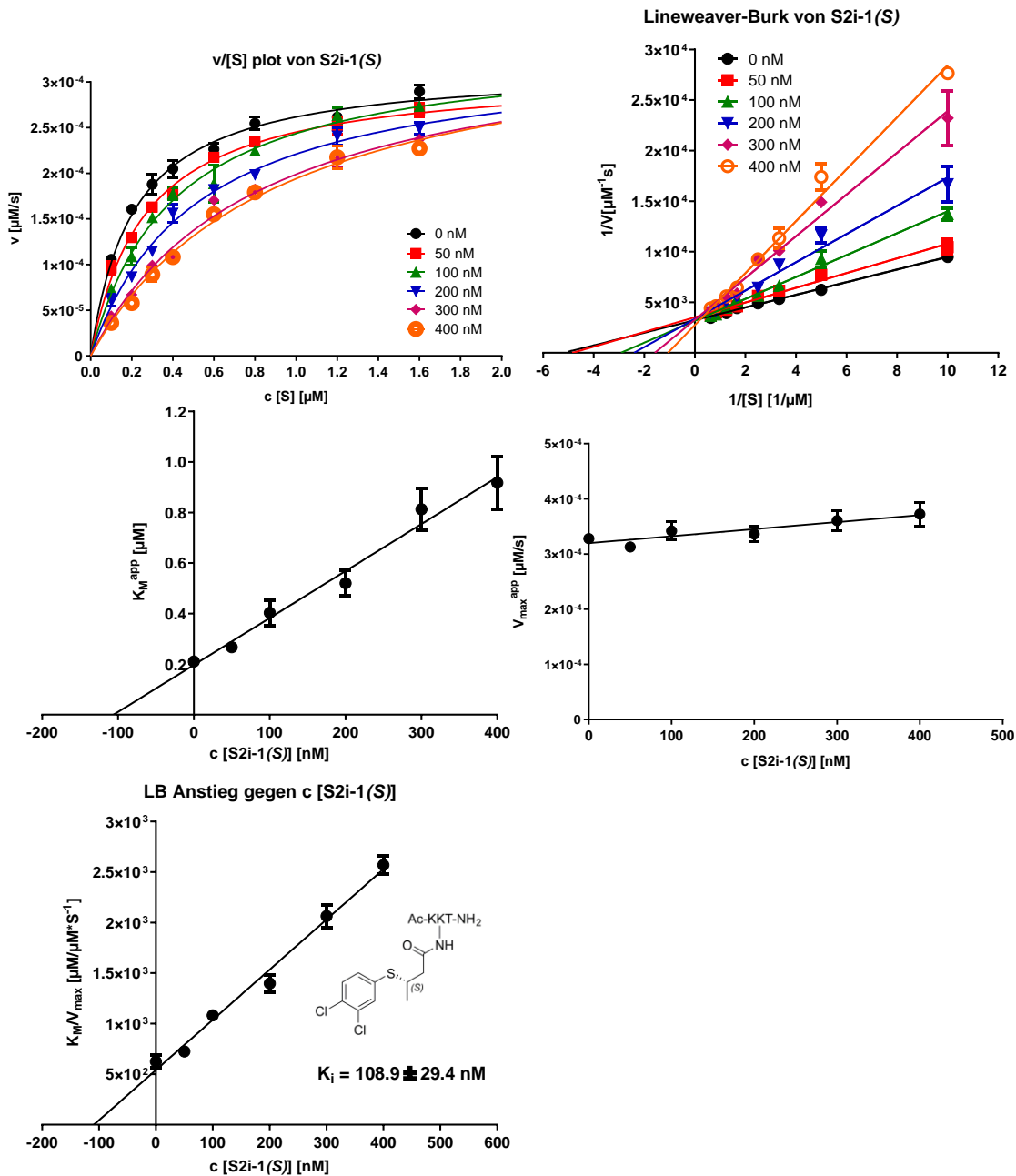


Abbildung S 30: v /[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat **S2i-1(S)**, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

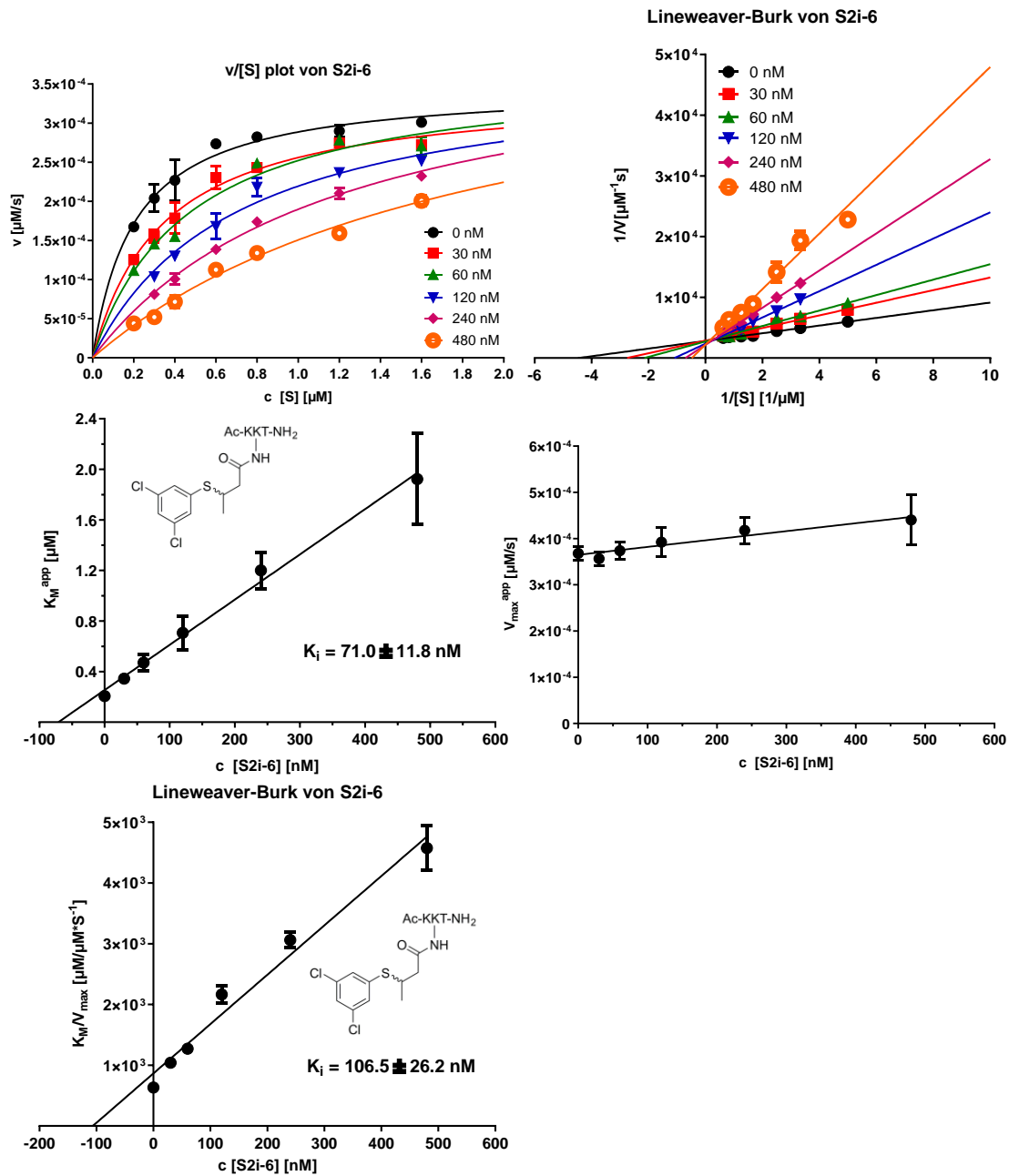


Abbildung S 31: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-6, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

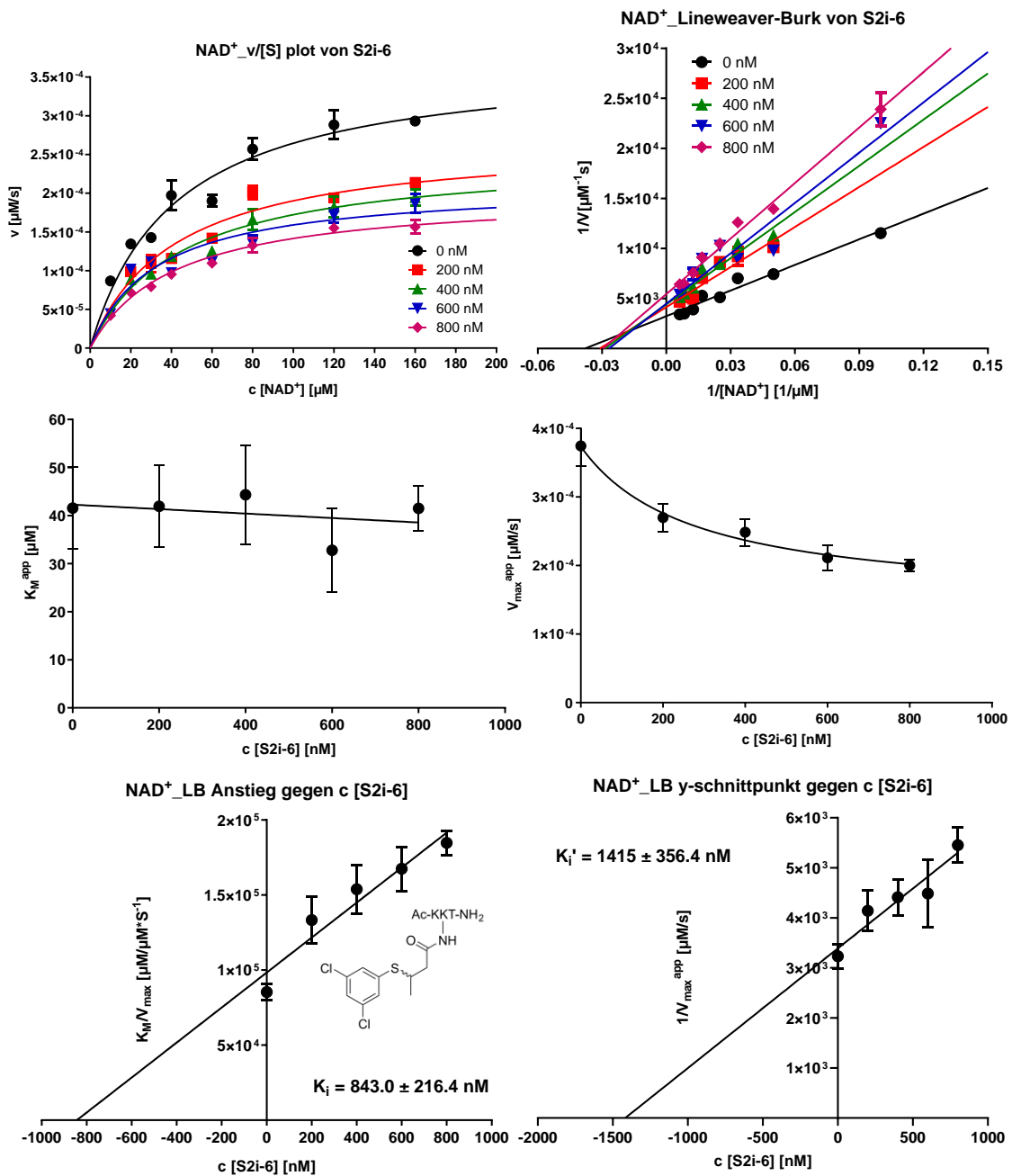


Abbildung S 32: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD^+ von Peptid-Derivat **S2i-6** und zeigt eine partial nicht-Kompetitive Inhibition gegen NAD^+ . Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_i' für den enzym-Inhibitor-substrat Komplex wurde aus dem Plot LB-Ordinatenschnittpunkt gegen c [Inhibitor] bestimmt.

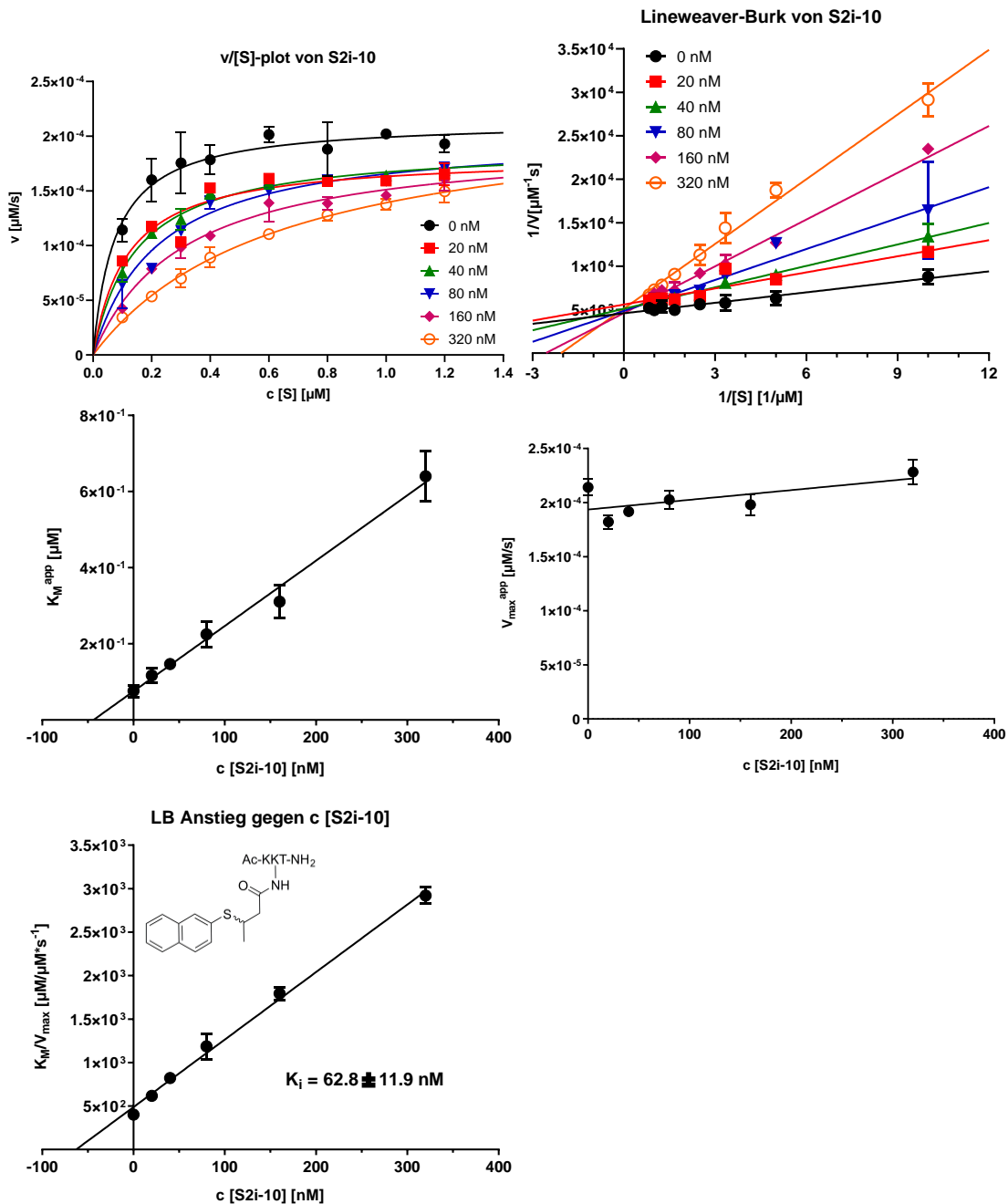


Abbildung S 33: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-KKT-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-10, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

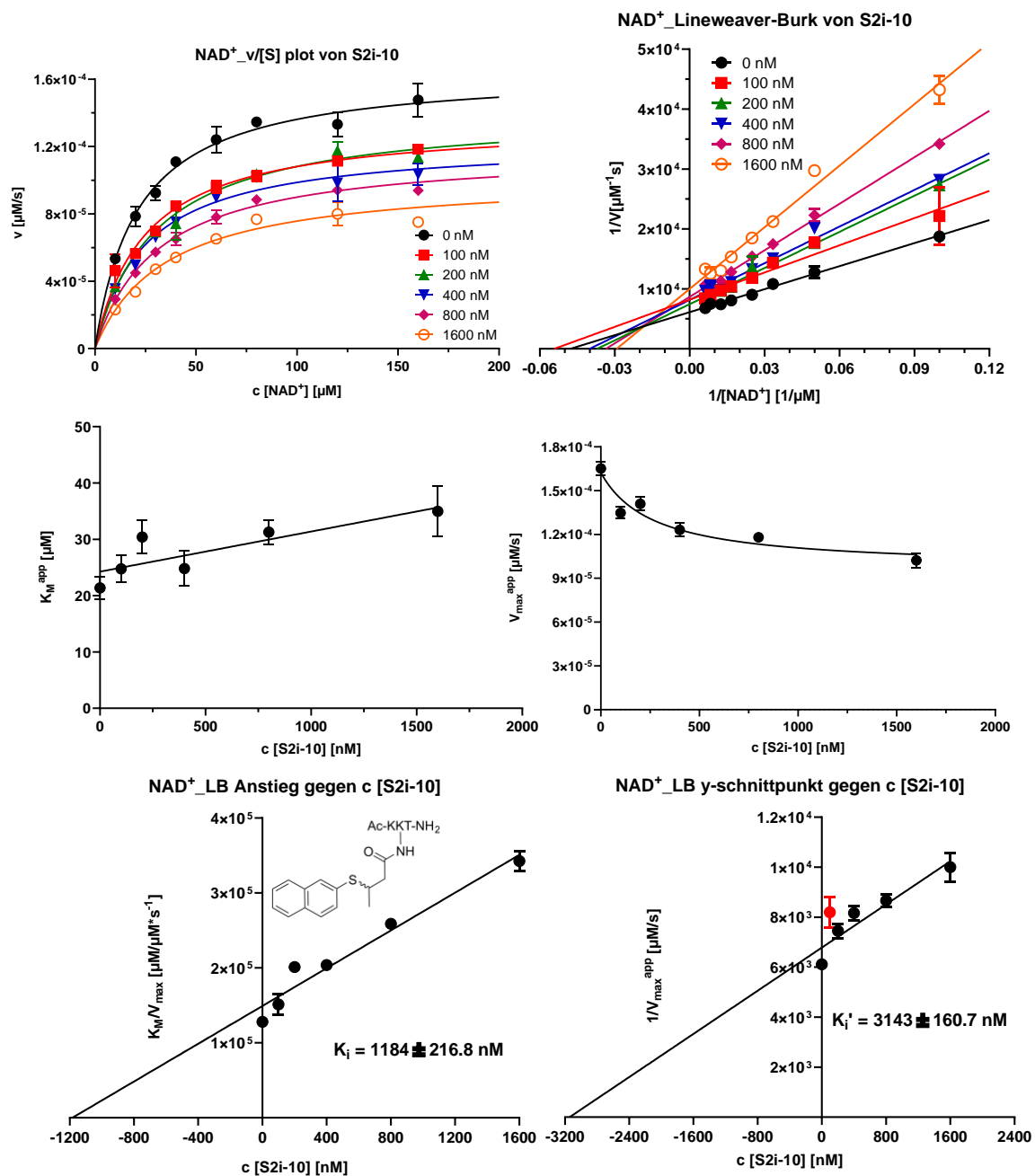


Abbildung S 34: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD^+ von Peptid-Derivat **S2i-10** und zeigt eine partial nicht-Kompetitive Inhibition gegen NAD^+ . Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_i' für den enzym-Inhibitor-substrat Komplex wurde aus dem Plot LB-Ordinatenschnittpunkt gegen c [Inhibitor] bestimmt.

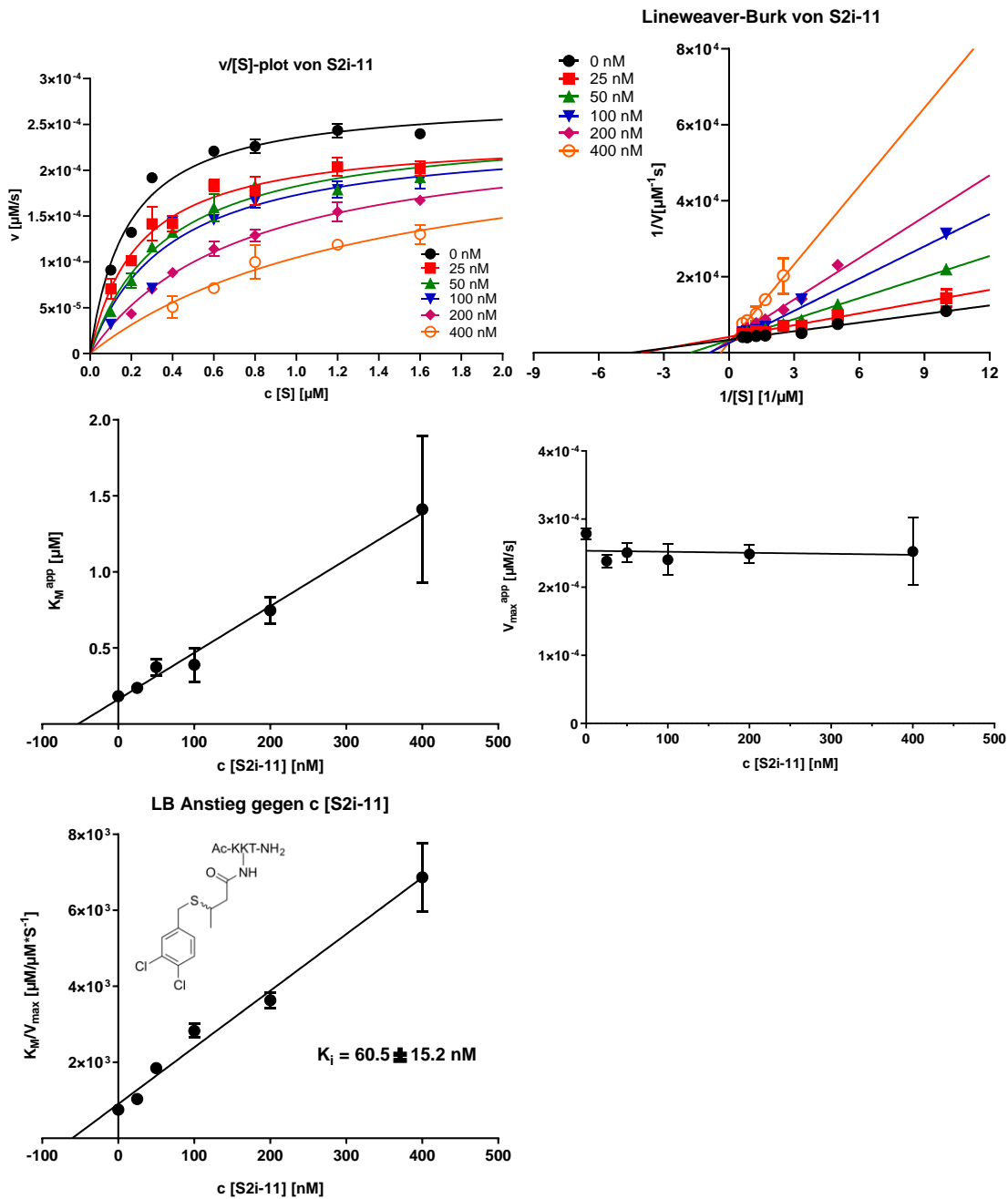


Abbildung S 35: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-11, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

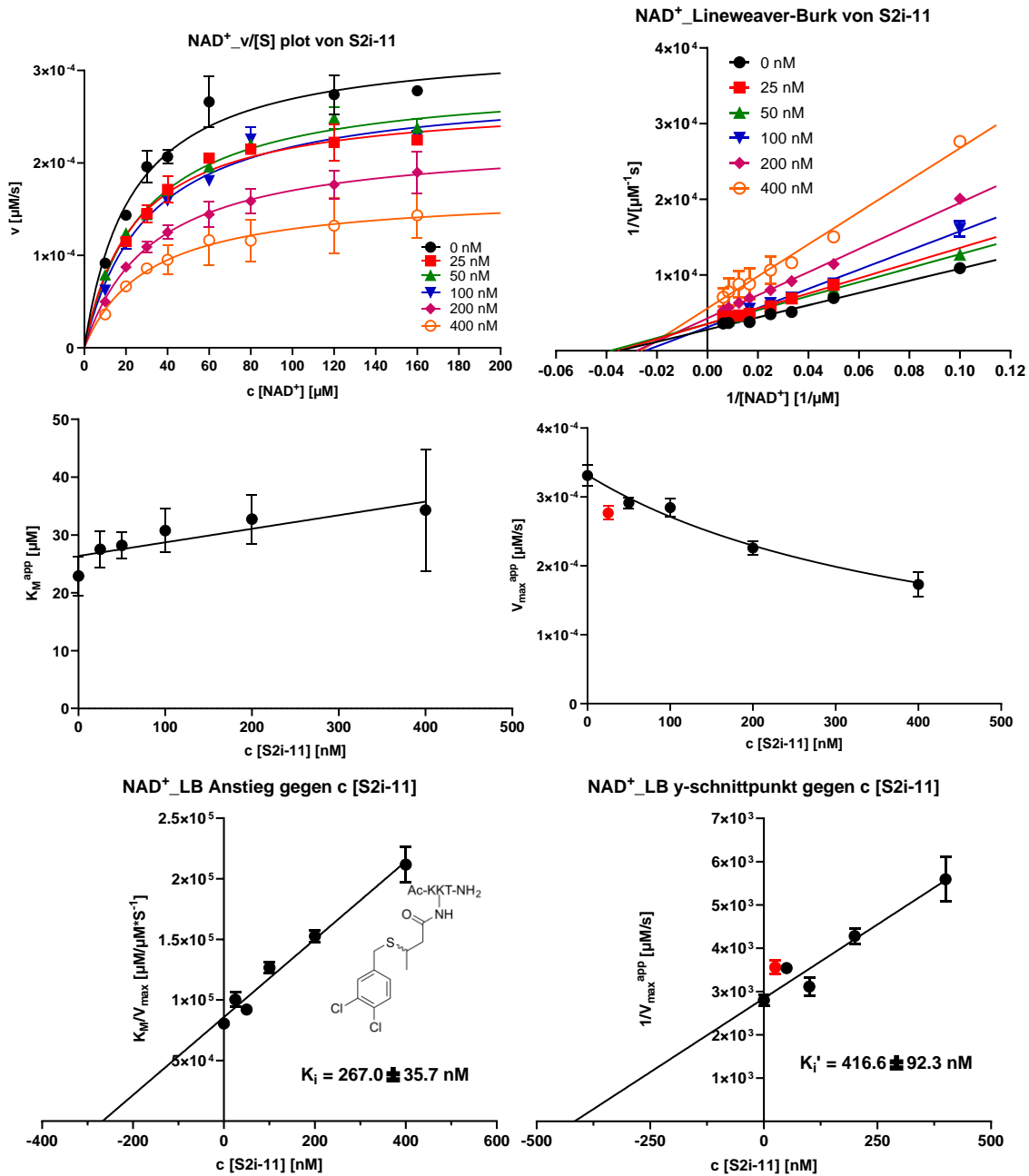


Abbildung S 36: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD^+ von Peptid-Derivat **S2i-11** und zeigt eine partial nicht-Kompetitive Inhibition gegen NAD^+ . Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_i' für den enzym-Inhibitor-Substrat Komplex wurde aus dem Plot LB-Ordinatenschnittpunkt gegen c [Inhibitor] bestimmt.

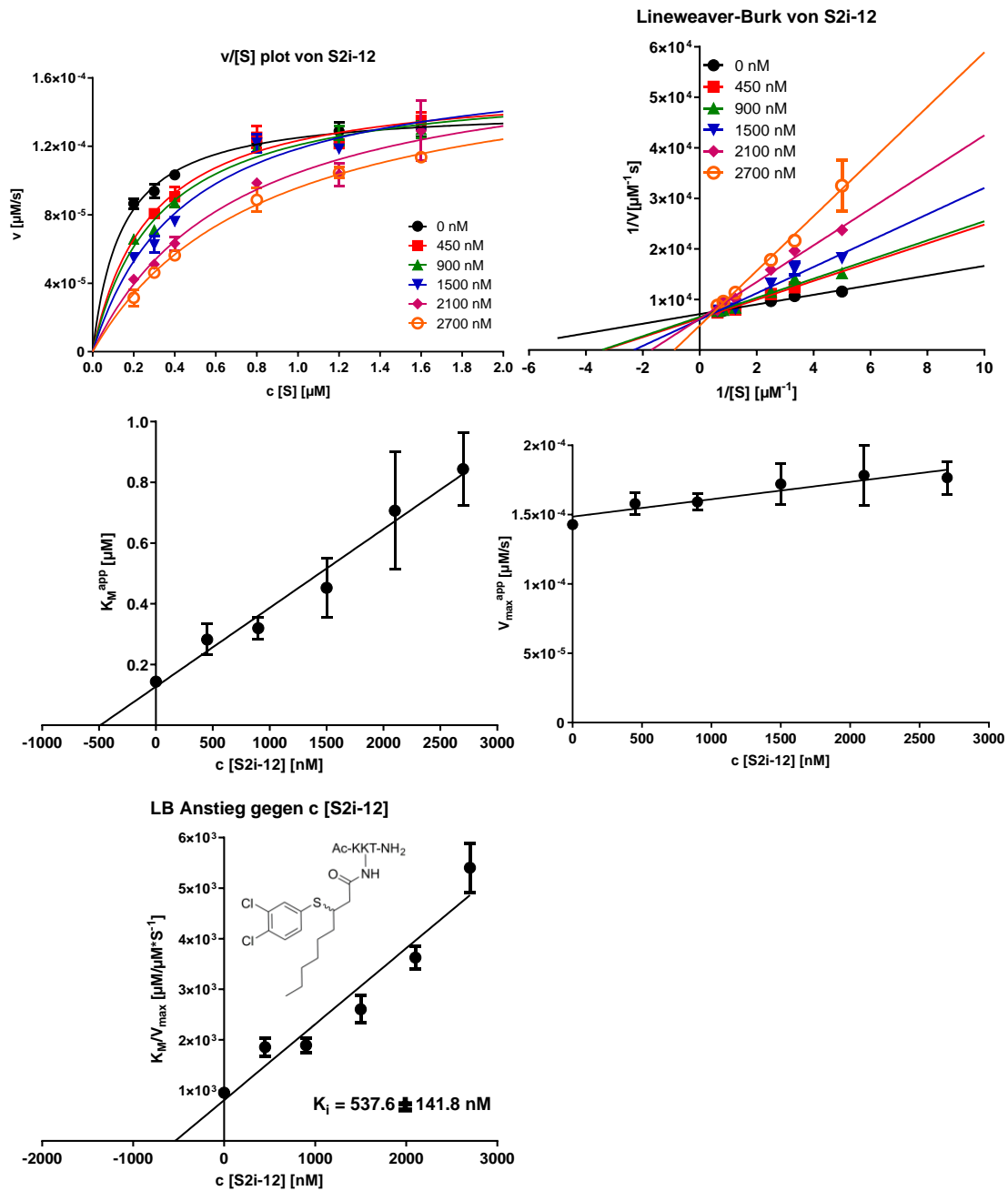


Abbildung S 37: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-KKKT-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-12, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

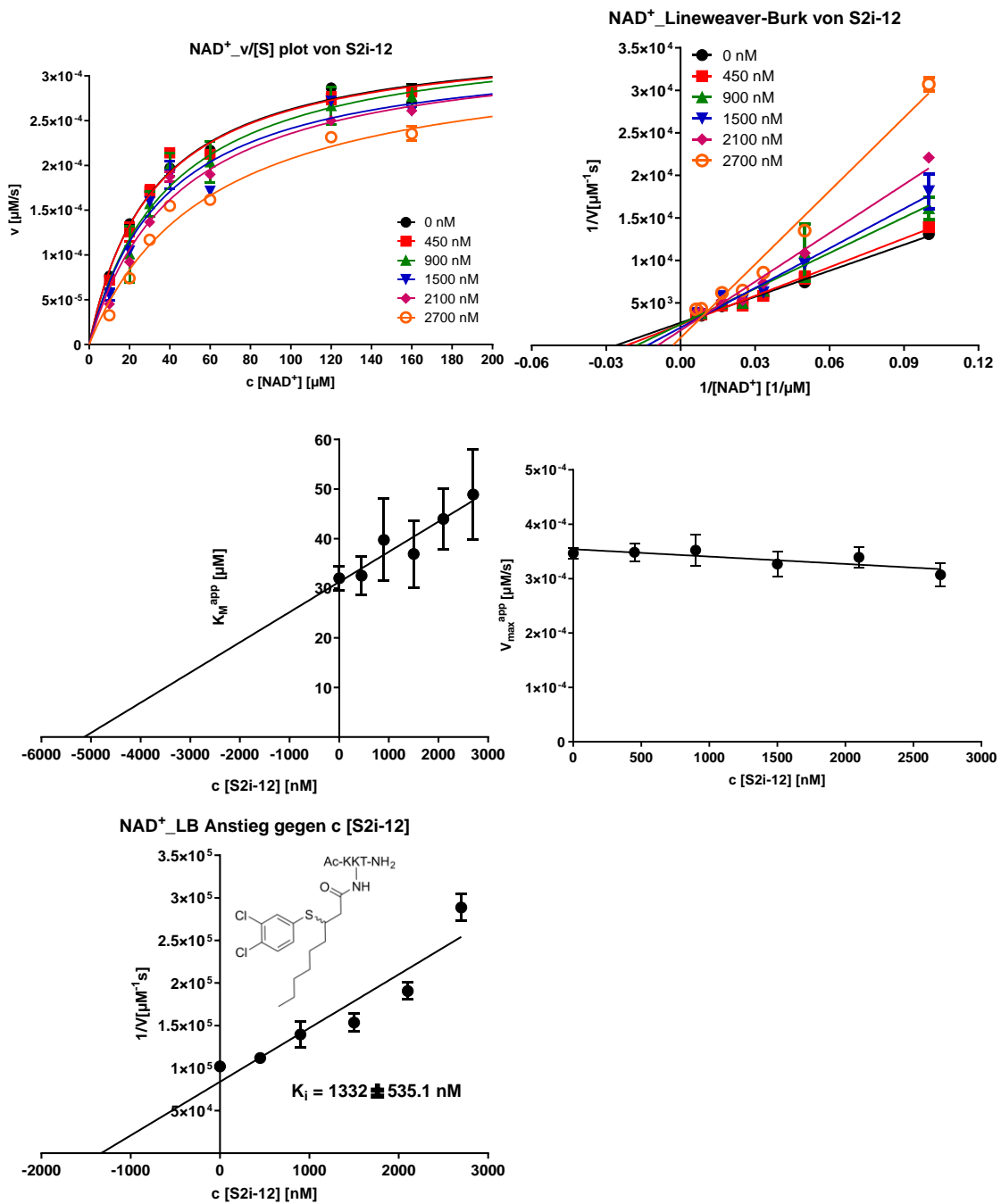


Abbildung S 38: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD^+ von Peptid-Derivat **S2i-11** und zeigt eine Kompetitive Inhibition gegen NAD^+ . Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

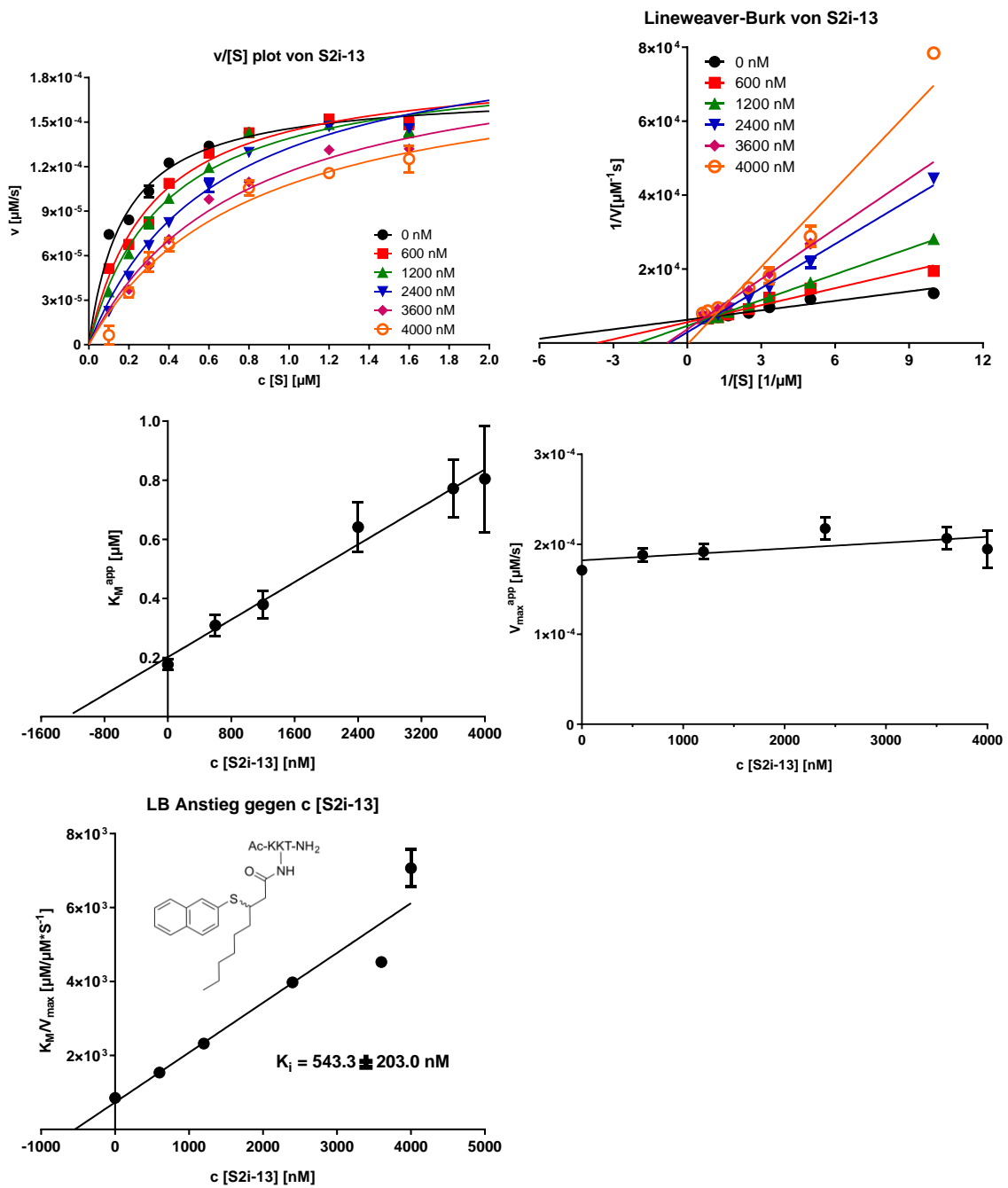


Abbildung S 39: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-KKT-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-13, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzyme-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

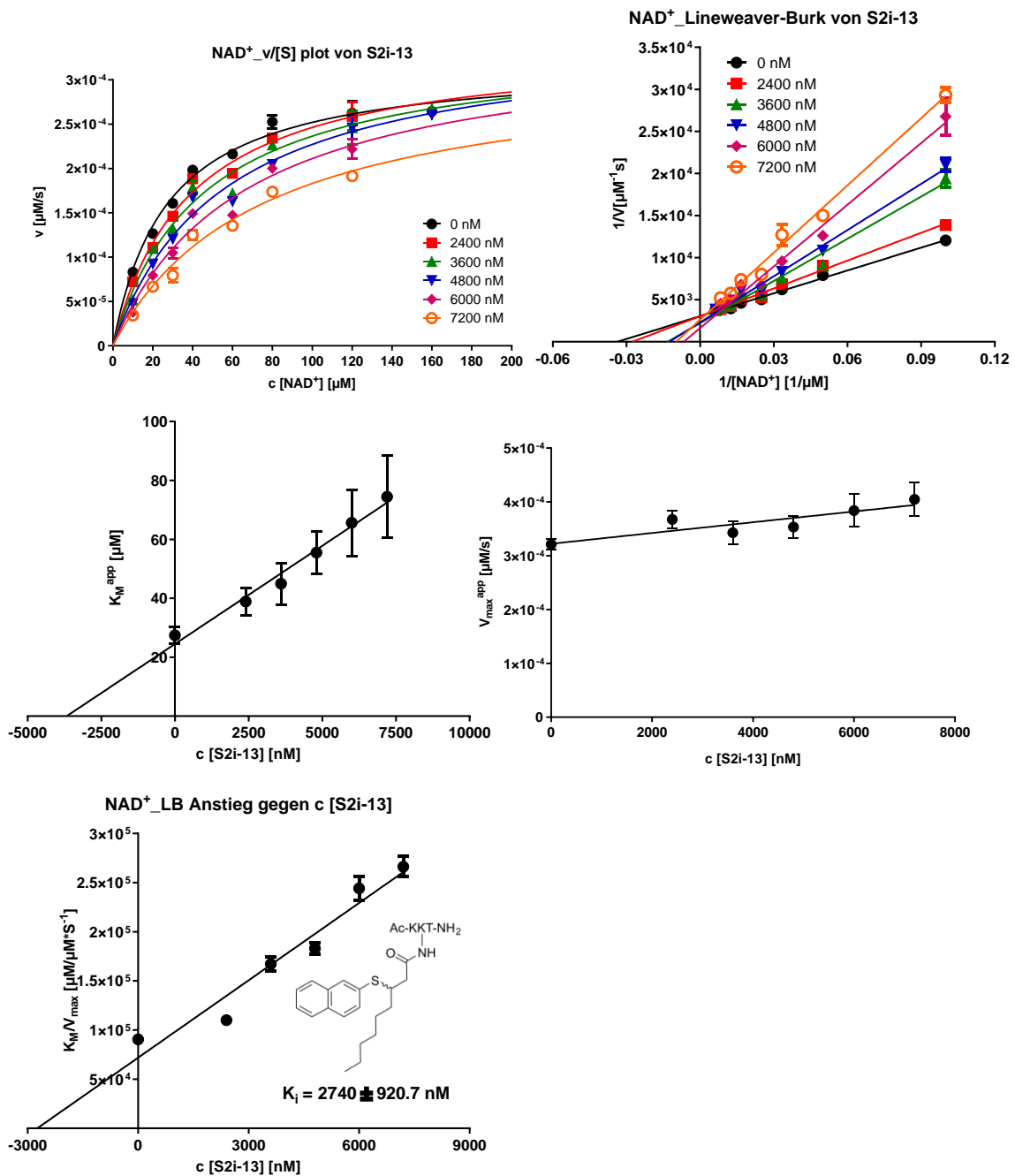


Abbildung S 40: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD⁺ von Peptid-Derivat **S2i-13** und zeigt eine Kompetitive Inhibition gegen NAD⁺. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

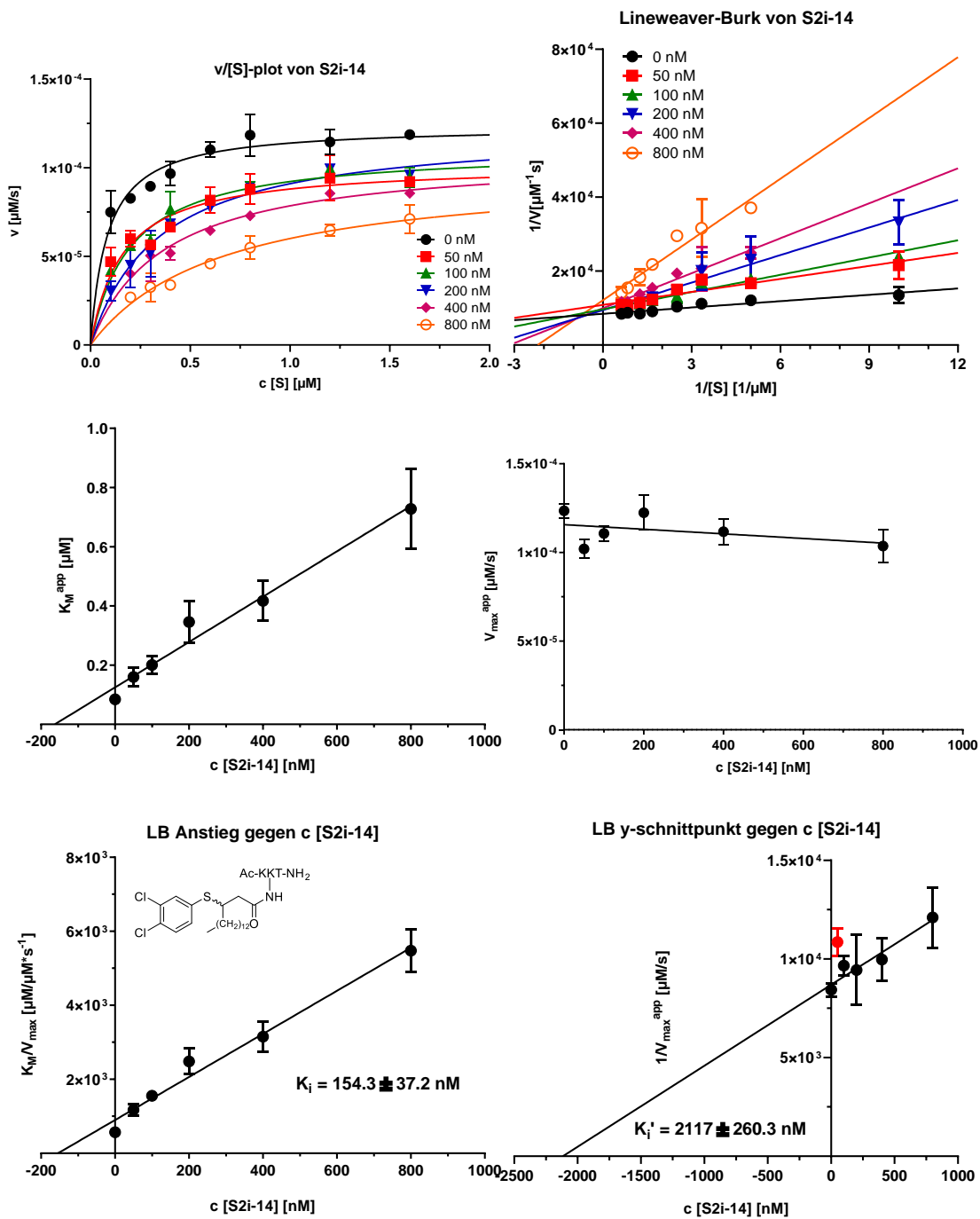


Abbildung S 41: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-KKT-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-14, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

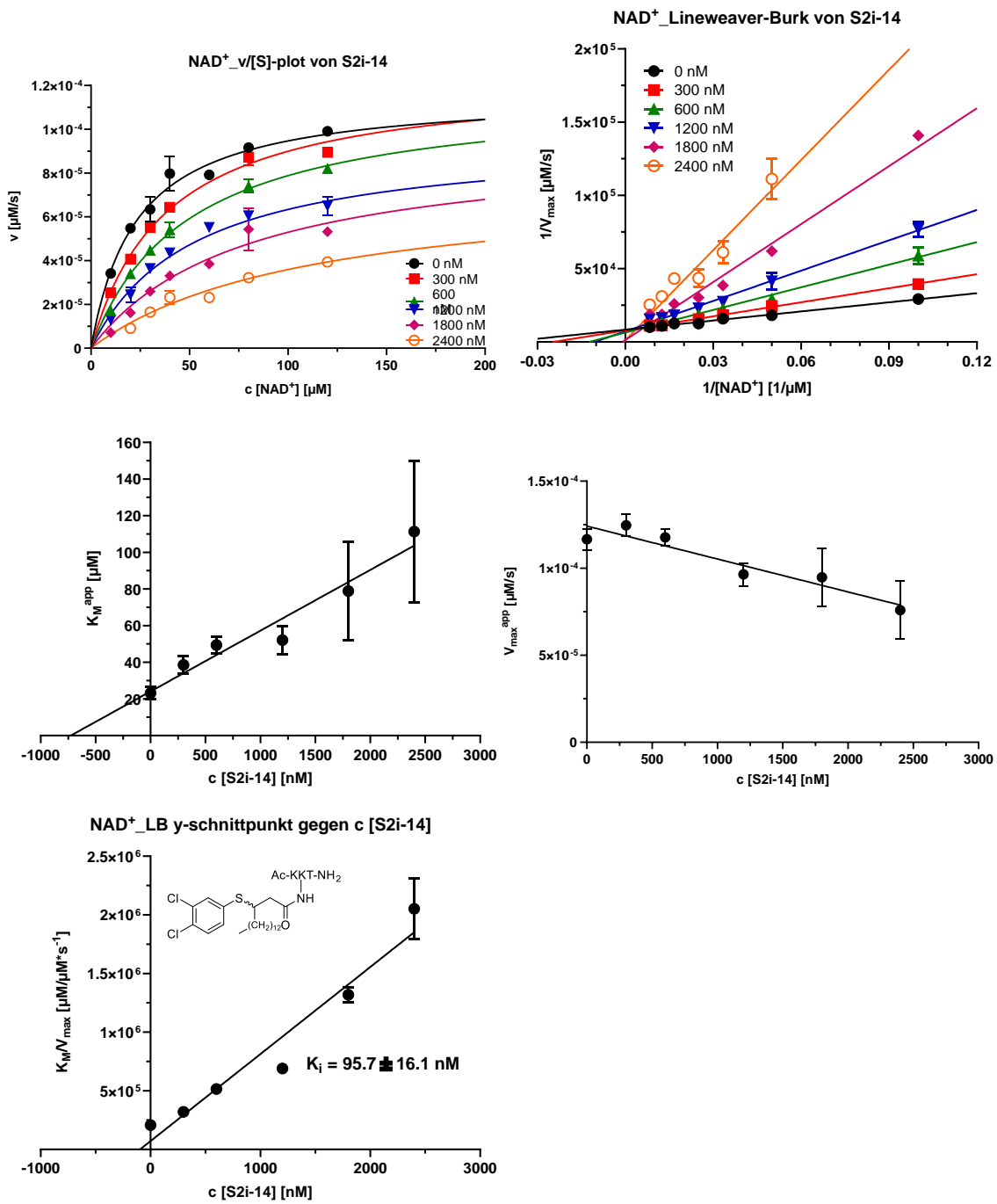


Abbildung S 42: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD⁺ von Peptid-Derivat **S2i-14** und zeigt eine Kompetitive Inhibition gegen NAD⁺. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

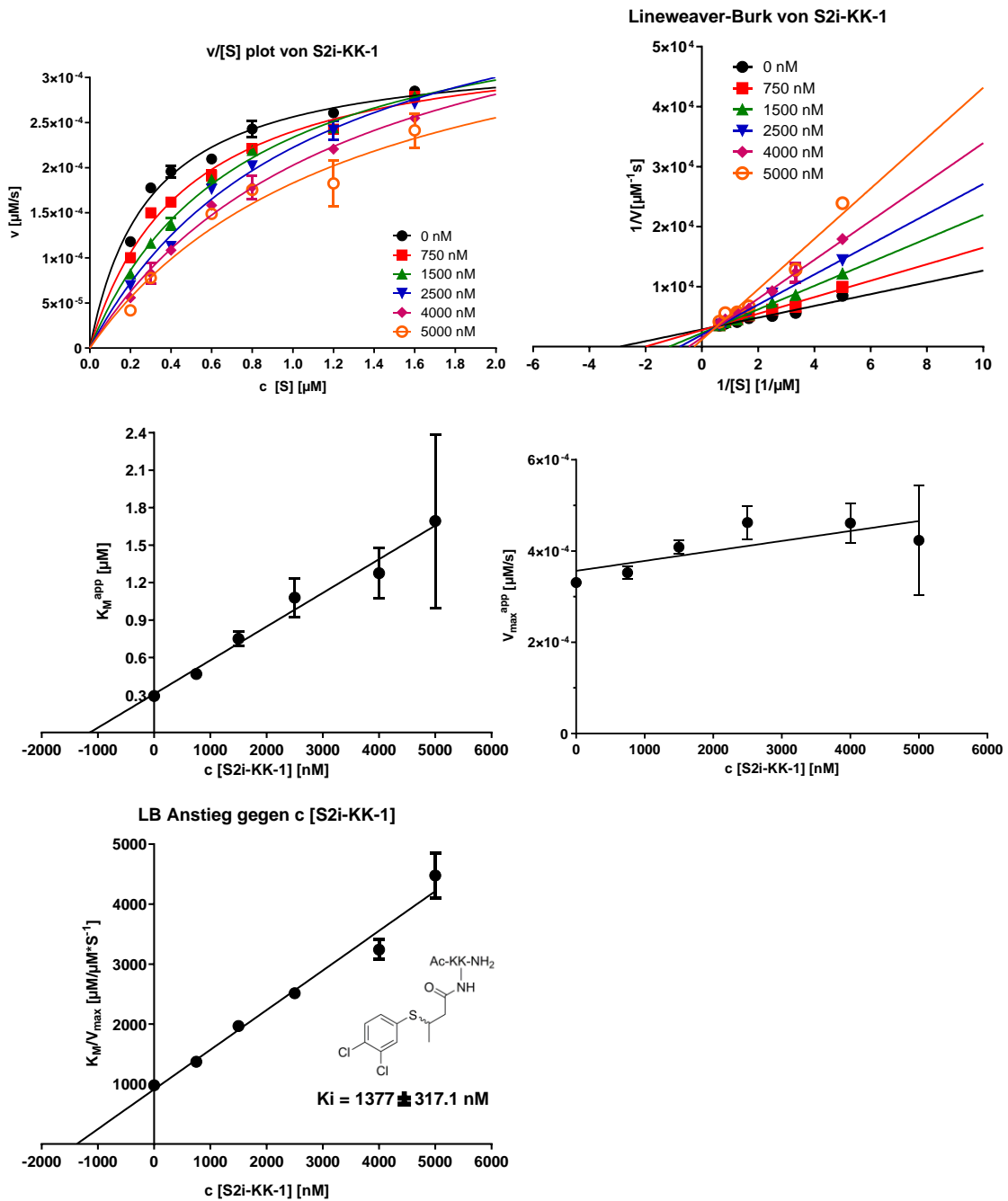


Abbildung S 43: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-KK-1, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

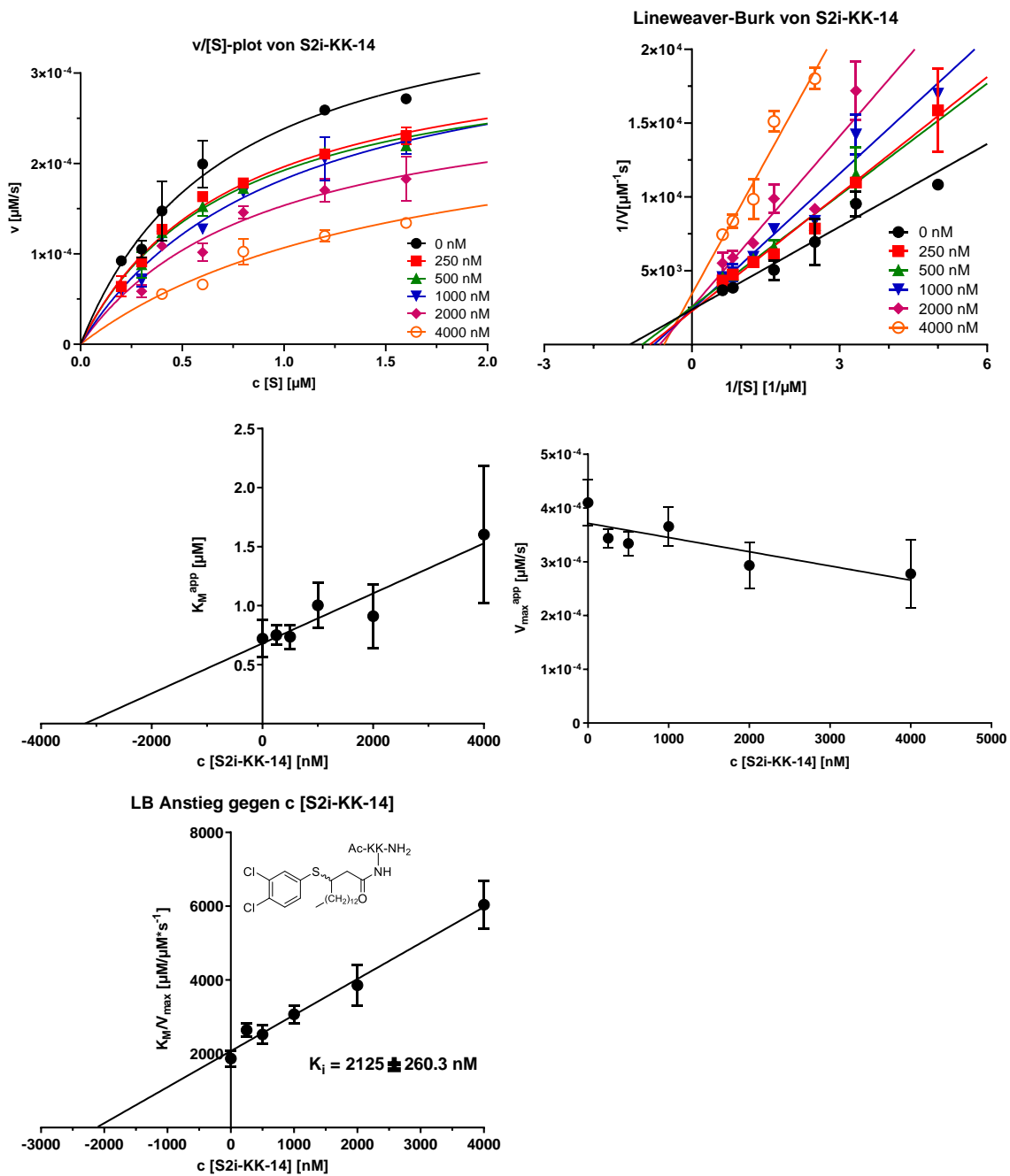


Abbildung S 44: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat **S2i-KK-14**, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

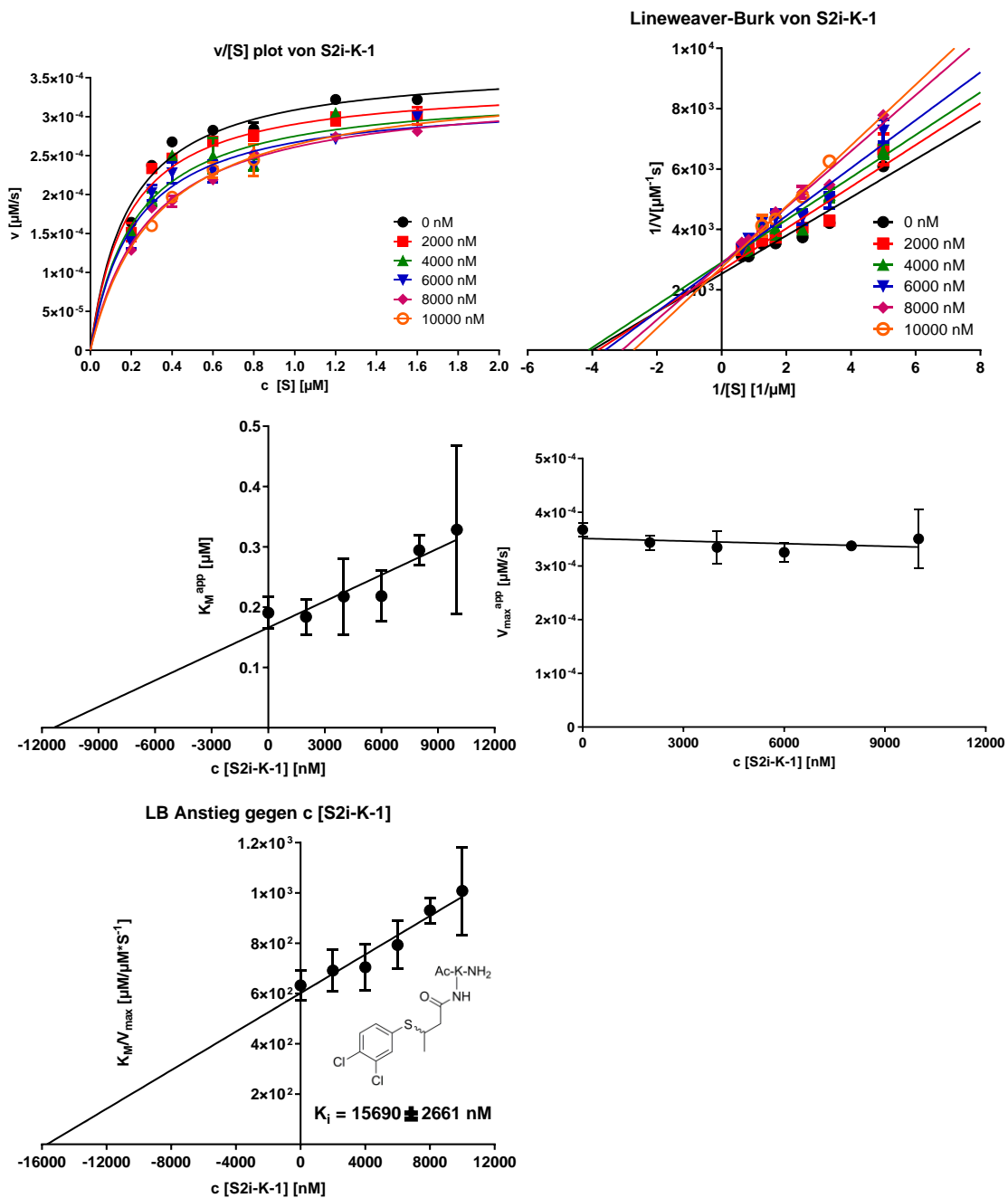


Abbildung S 45: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-K-1, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

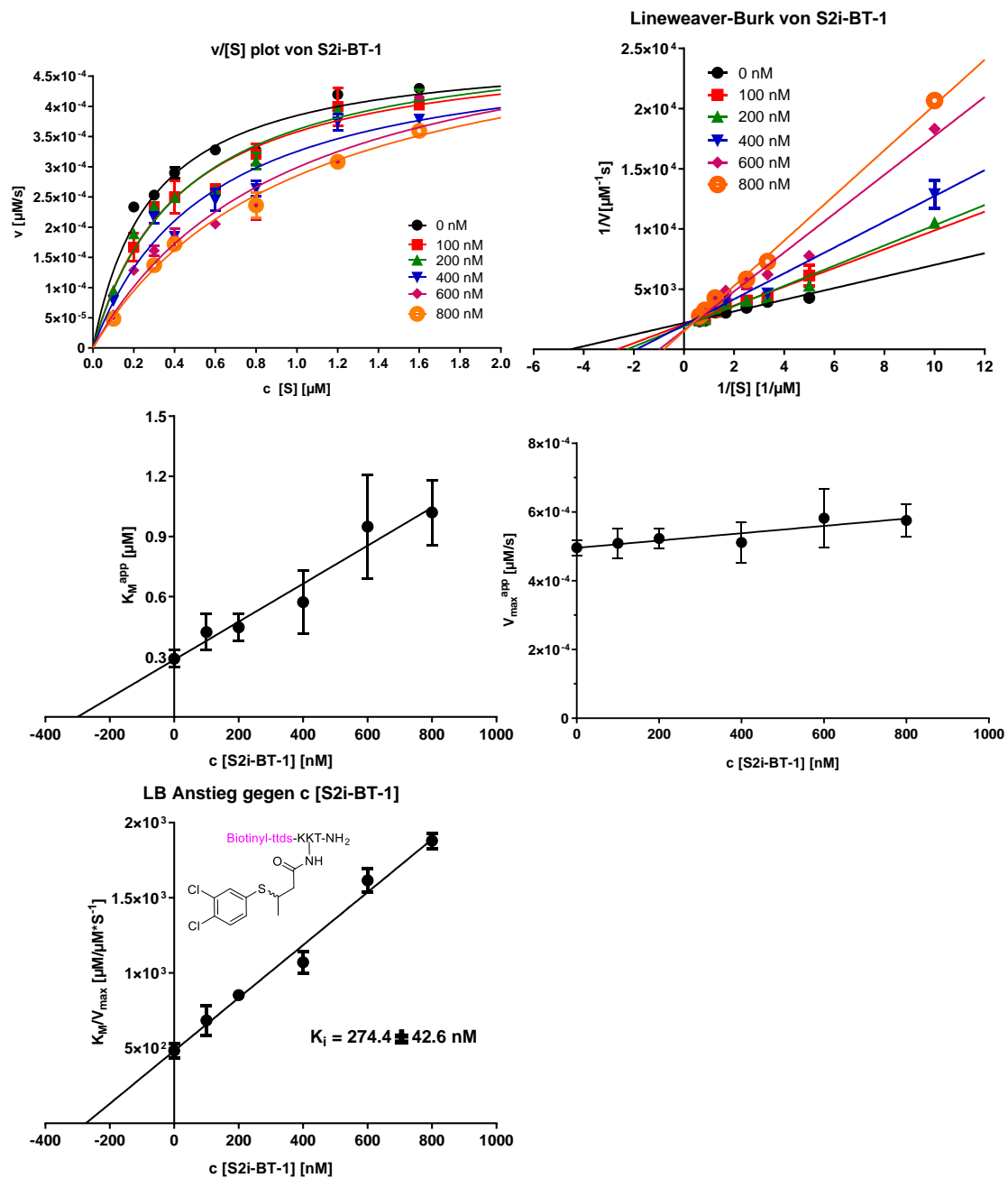


Abbildung S 46: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-BT-1, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

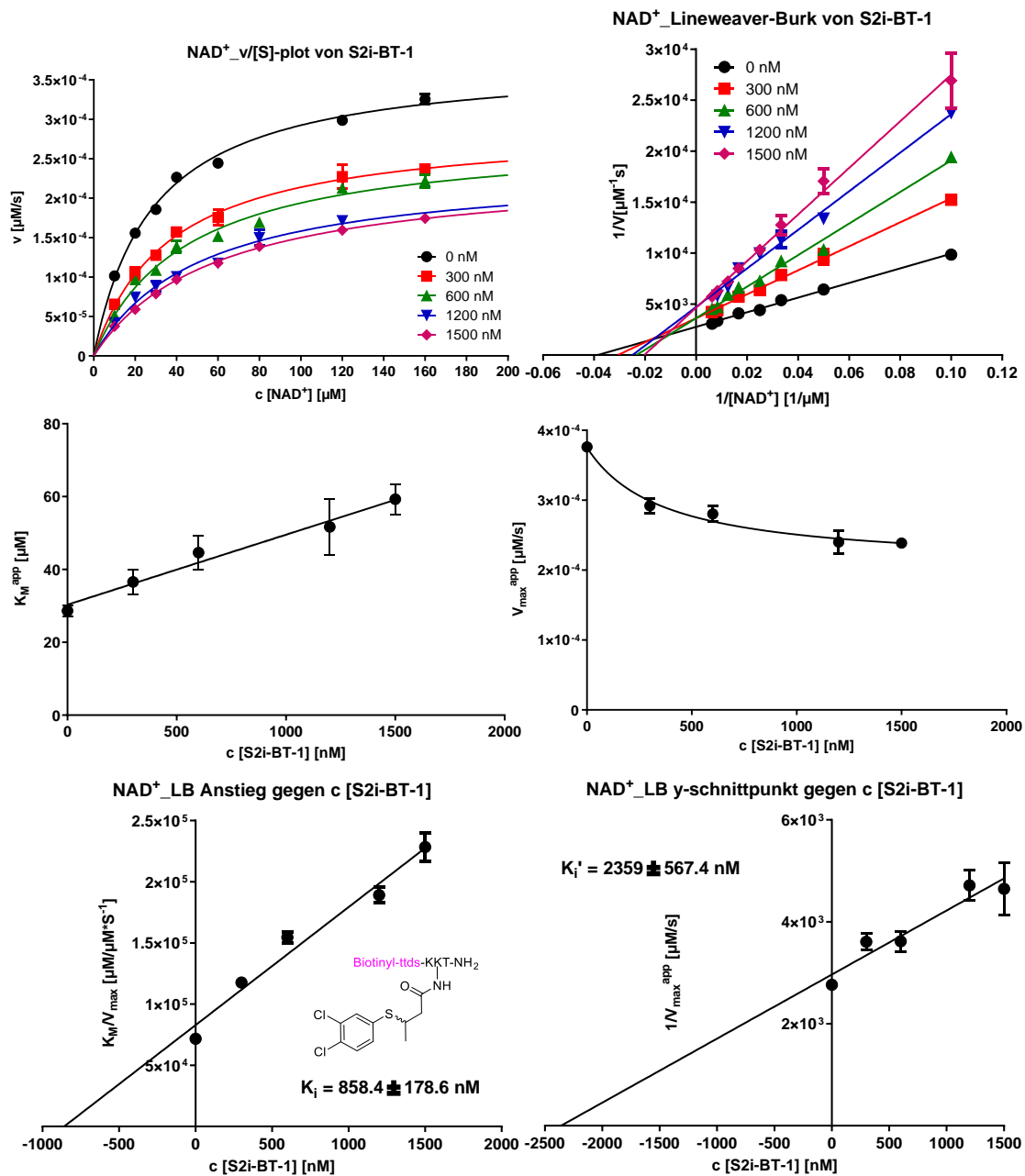


Abbildung S 47: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD^+ von Peptid-Derivat **S2i-BT-1** und zeigt eine partial nicht-Kompetitive Inhibition gegen NAD^+ . Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_i' für den enzym-Inhibitor-substrat Komplex wurde aus dem Plot LB-Ordinatenschnittpunkt gegen c [Inhibitor] Konzentration bestimmt.

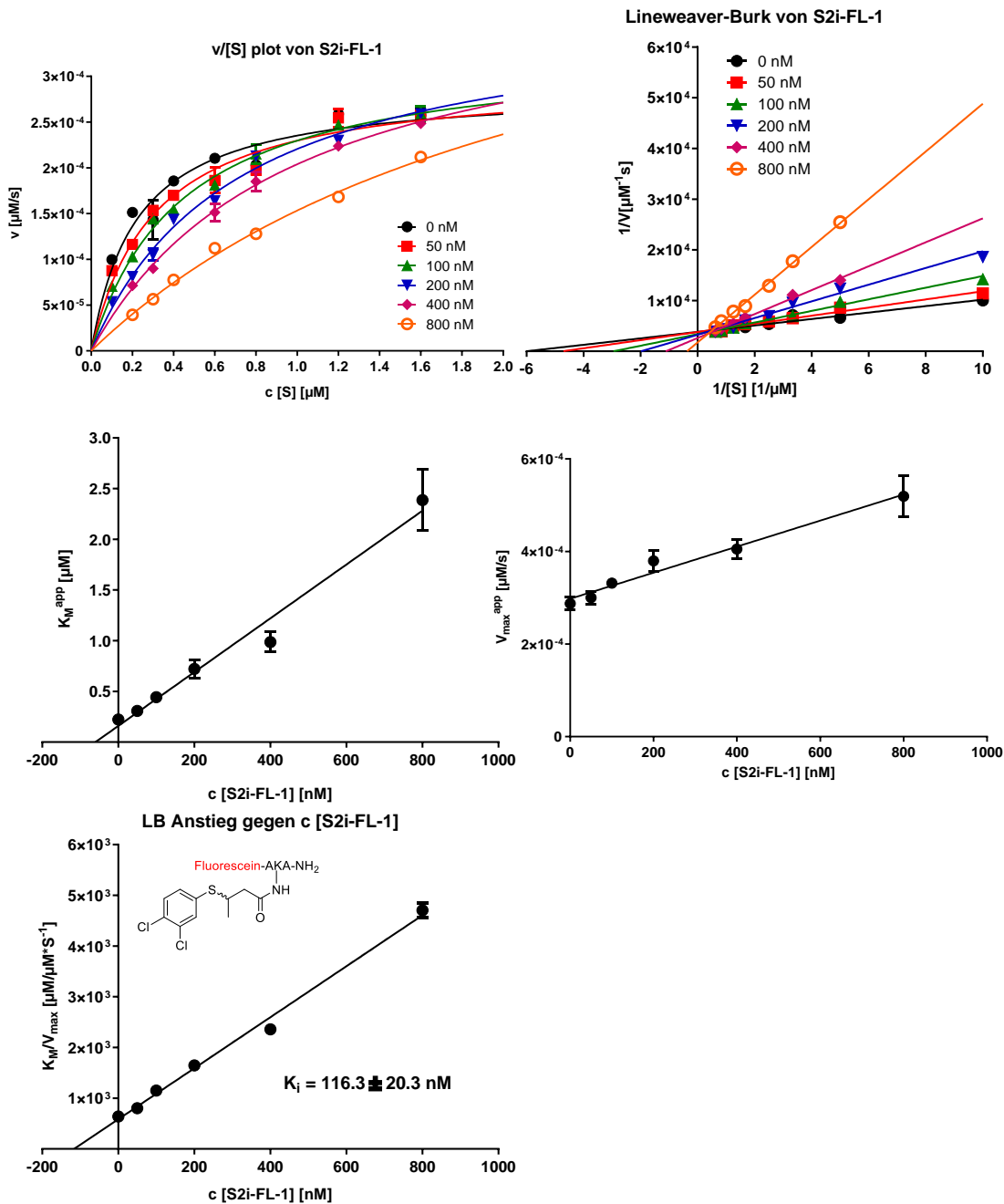


Abbildung S 48: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat S2i-FL-1, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

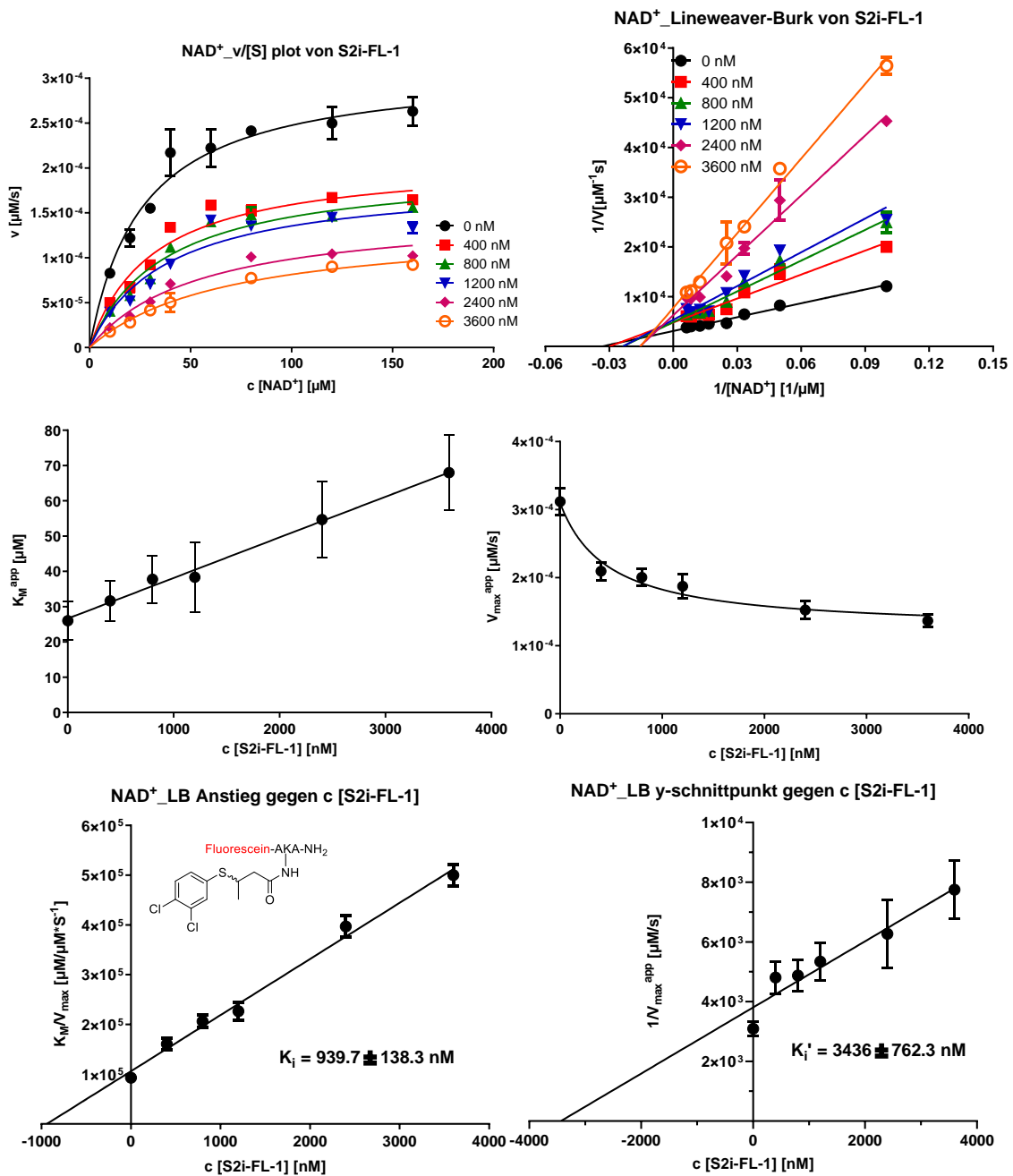


Abbildung S 49: $v/[S]$ plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD^+ von Peptid-Derivat **S2i-FL-1** und zeigt eine partial nicht-Kompetitive Inhibition gegen NAD^+ . Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_i' für den enzym-Inhibitor-substrat Komplex wurde aus dem Plot LB-Ordinatenschnittpunkt gegen c [Inhibitor] Konzentration bestimmt.

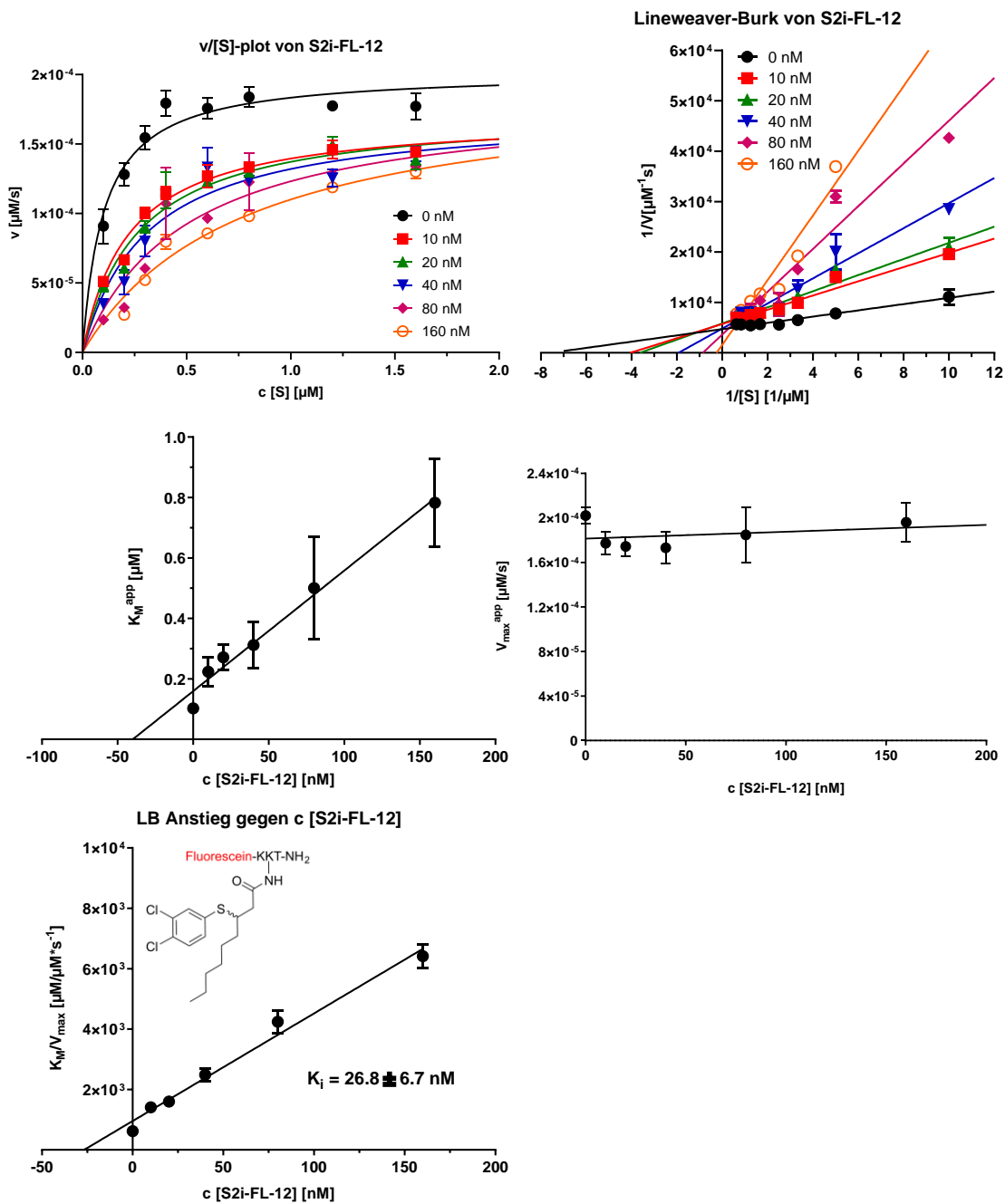


Abbildung S 50: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen Peptid Ac-EALPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ von Peptid-Derivat **S2i-FL-12**, zeigt eine kompetitive Inhibition gegen Peptid. Die Dissoziationskonstante K_i für den enzyme-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

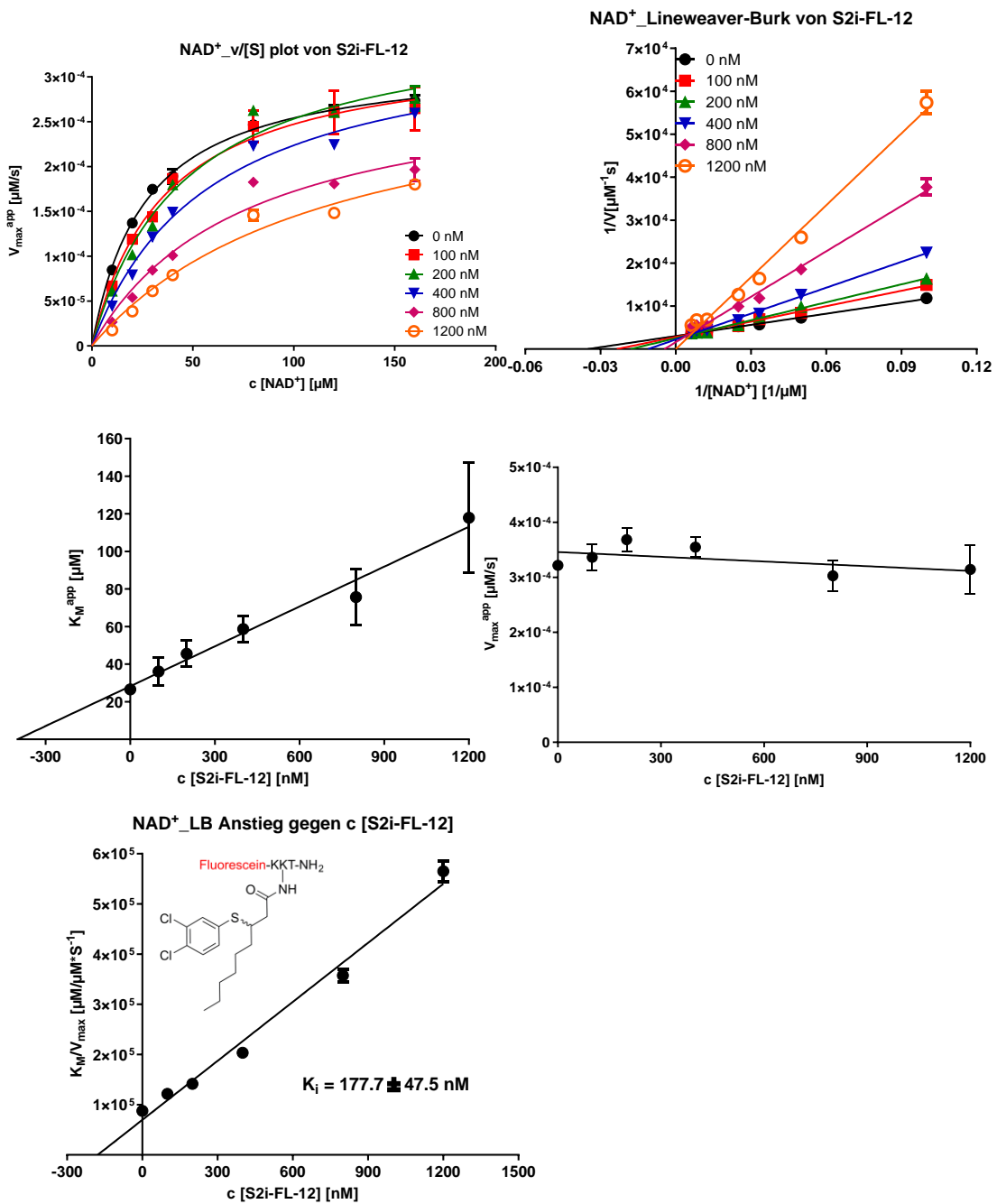
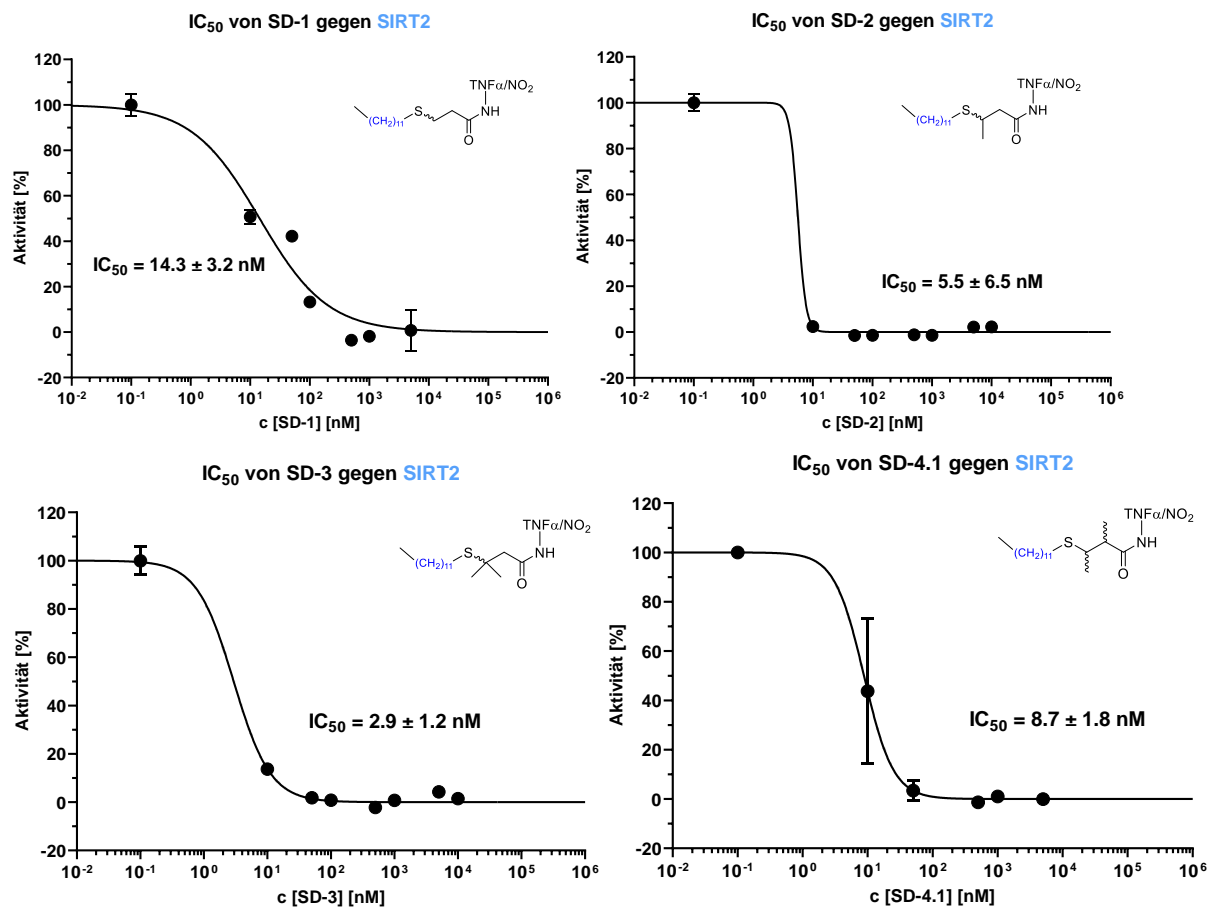


Abbildung S 51: v/[S] plot, Lineweaver Burk plot und K_i Bestimmung gegen NAD⁺ von Peptid-Derivat **S2i-FL-12** und zeigt eine Kompetitive Inhibition gegen NAD⁺ Die Dissoziationskonstante K_i für den enzym-Inhibitor Komplex wurde aus dem Plot LB-Anstieg gegen c [Inhibitor] bestimmt.

IC₅₀ Messungen Der SD-Peptid-Derivate gegen SIRT2 und SIRT3**Tabelle S 2:** Überblick der gemessenen IC₅₀-Werte gegen Peptid Bz-AELPKK(11-Aun-Abz)Y(NO₂)GG-NH₂ mit SIRT2 und SIRT3

| Peptid-Derivat | IC ₅₀ Sirt2 | IC ₅₀ Sirt3 [nM] |
|----------------|------------------------|-----------------------------|
| SD-1 | 14.3 ± 3.2 | 2699 ± 287 |
| SD-2 | 5.5 ± 6.5 | 660 ± 60 |
| SD-3 | 2.9 ± 1.2 | 190 ± 64 |
| SD-4.1 | 8.7 ± 1.8 | 479 ± 37 |
| SD-4.2 | 2.6 ± 0.7 | 1241 ± 90 |
| SD-5 | 4.7 ± 0.8 | 743 ± 106 |
| SD-6 | 3.4 ± 0.4 | 571 ± 17 |
| SD-7 | 13.3 ± 7.2 | 246 ± 19 |
| SD-8 | 4.4 ± 1.0 | 1045 ± 99 |
| SD-9 | 3.1 ± 1.2 | 121 ± 17 |
| SD-10 | 7.0 ± 1.8 | 1124 ± 76 |
| SD-KKT-2 | 3.0 ± 0.7 | Nicht vermessen |
| SD-KKT-2a | 276 ± 52 | > 15 000 |
| SD-KKT-2b | 582.0 ± 49.9 | Nicht vermessen |
| SD-KK-1 | 109.6 ± 20.3 | Keine Inhibierung gemessen |
| SD-KK-2 | 15.4 ± 1.7 | > 50 000 |
| SD-KK-2b | 2008 ± 178.1 | Nicht vermessen |
| SD-KK-3 | 9.77 ± 2.1 | 2527 ± 790.7 |
| SD-KK-7 | 18.5 ± 3.4 | 337 ± 88 |
| SD-K-2 | 39.5 ± 4.3 | Keine Inhibierung gemessen |
| SD-CF-2 | 13.1 ± 4.2 | 4472 ± 1593 |

**Abbildung S 52:** IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-1 bis SD-4.1 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

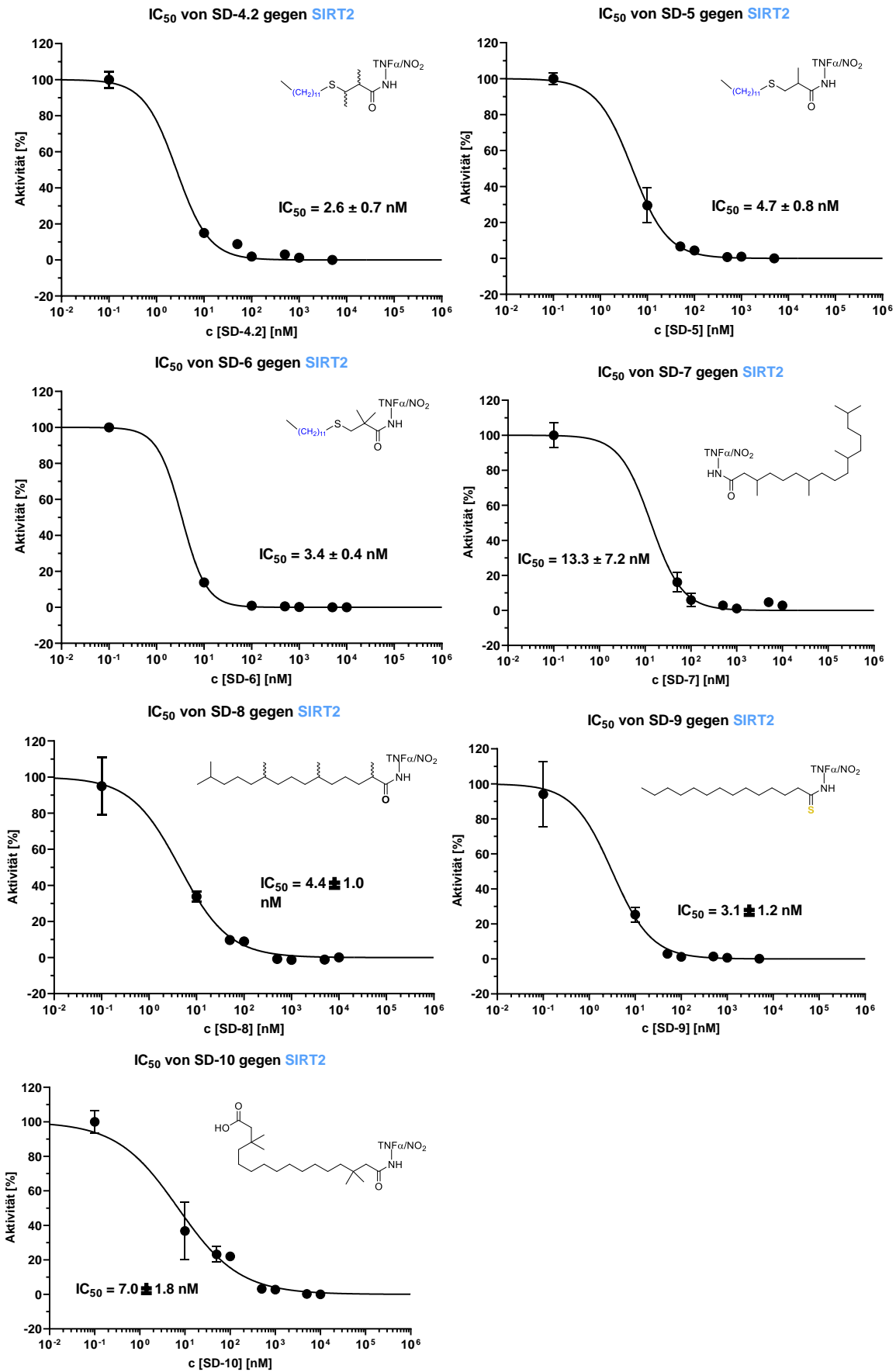
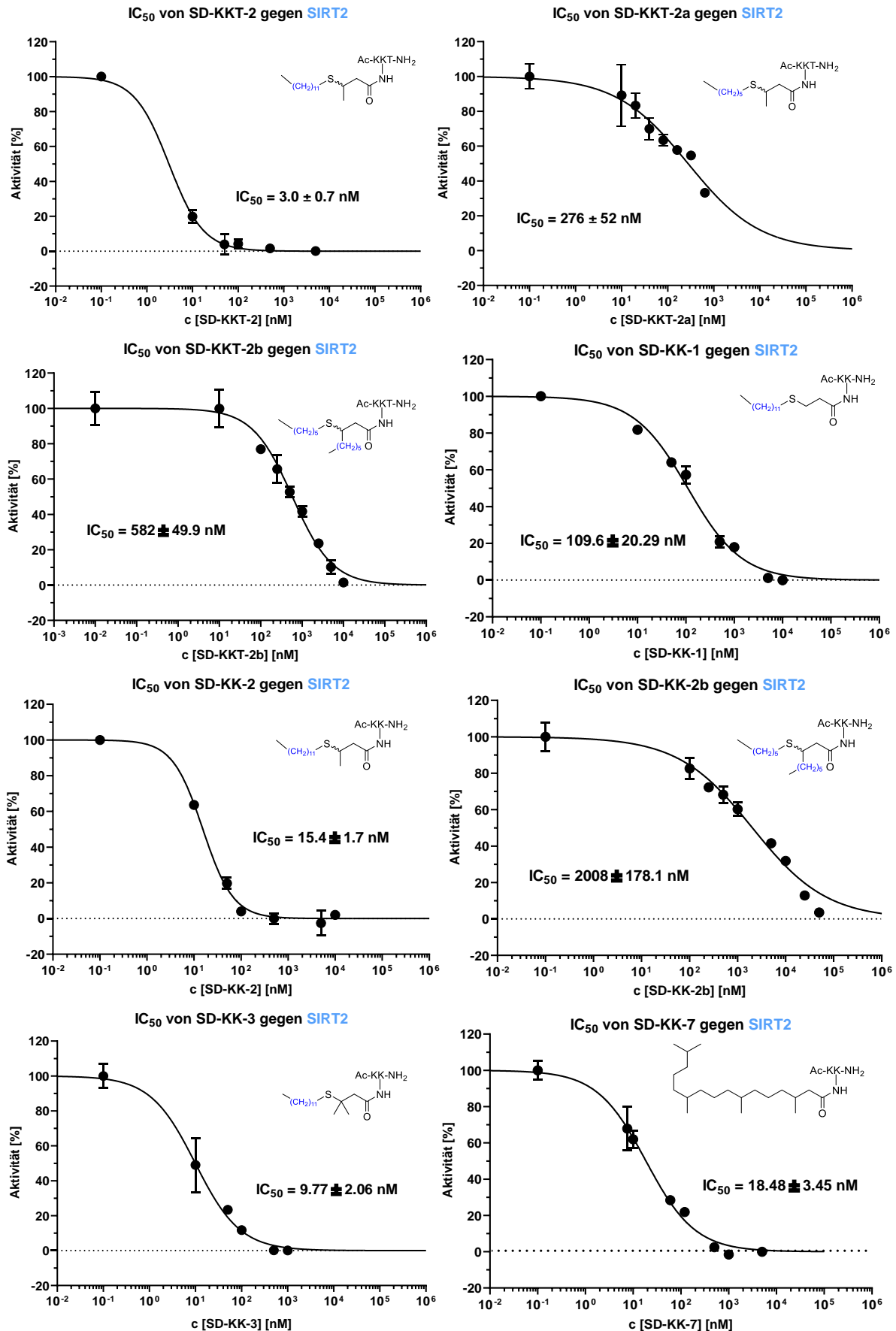
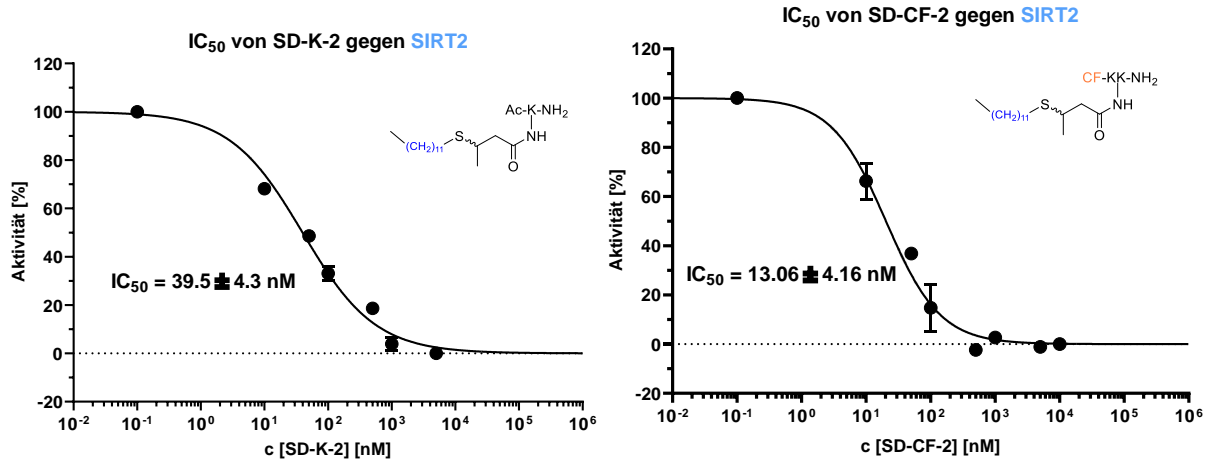
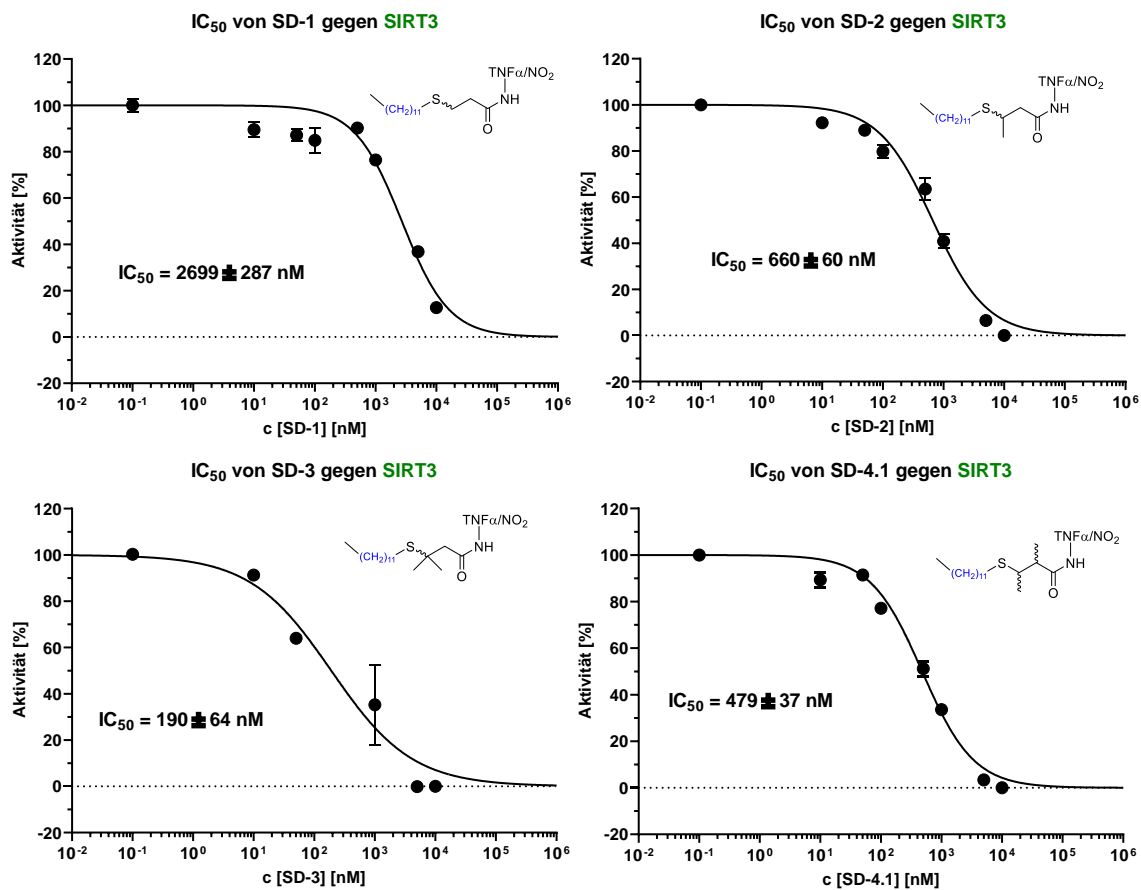


Abbildung S 53: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-4.2 bis SD-10 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

Abbildung S 54: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-KKT-2 bis SD-KK-7 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

Abbildung S 55: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-K-2 und SD-CF-2 gegen SIRT2 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-AssayAbbildung S 56: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-1 bis SD-4.1 gegen SIRT3 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

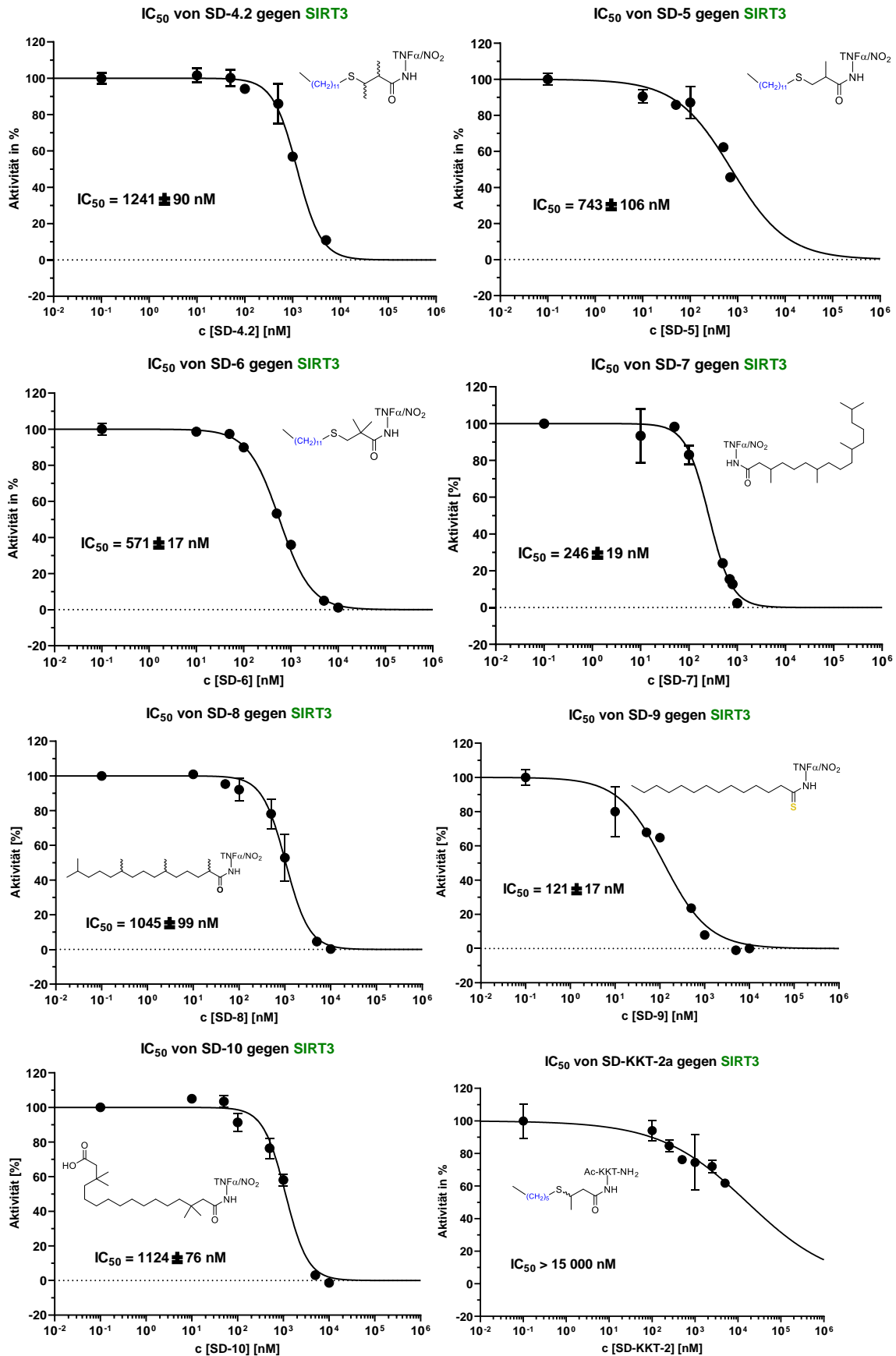


Abbildung S 57: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-4.2 bis SD-10 und SD-KKT-2a gegen SIRT3 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

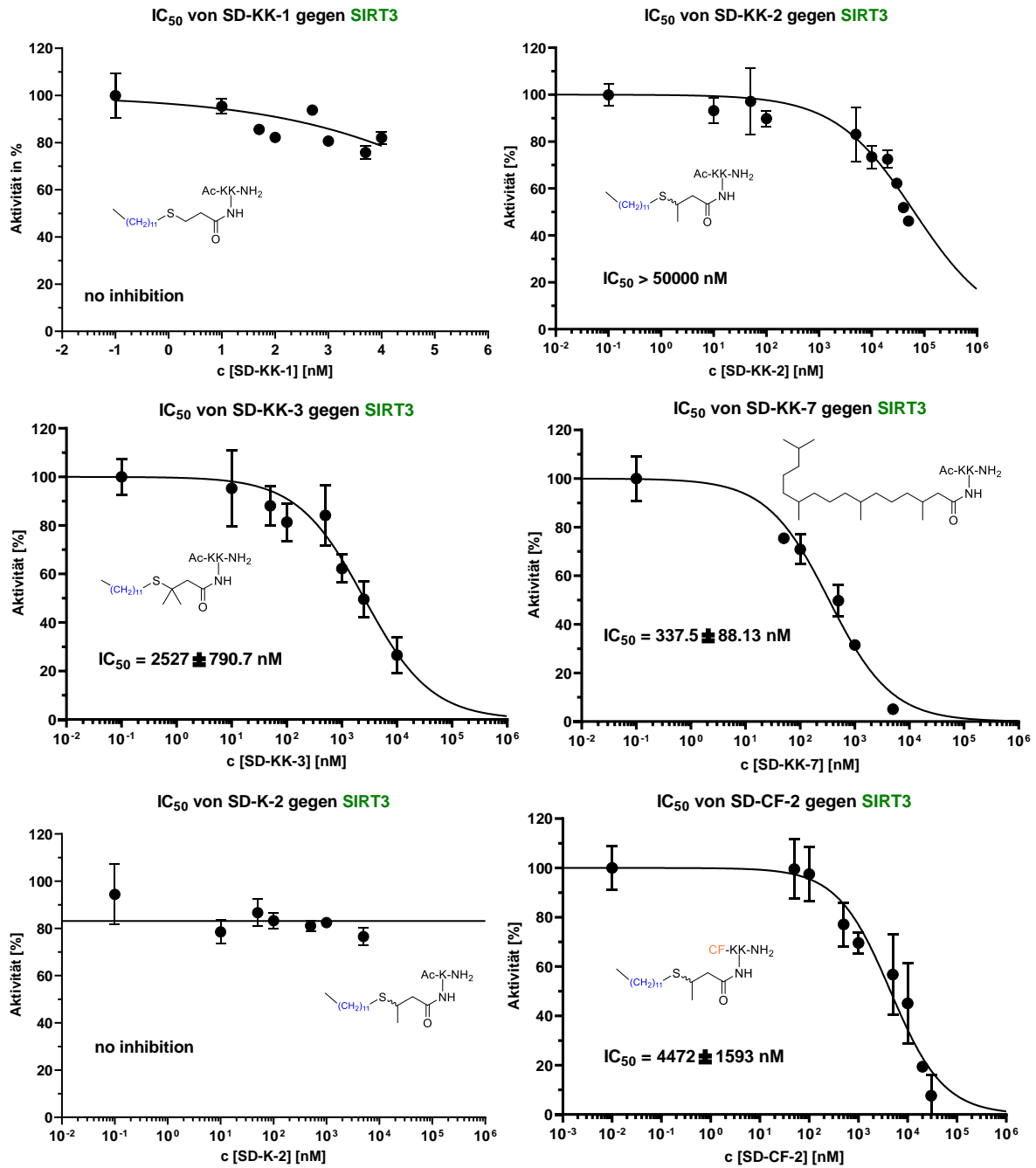


Abbildung S 58: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate SD-KK-1 bis SD-KK-7 und SD-K-2 und SD-CD-2 gegen SIRT3 gemessen mit MTPR Fluoreszenz-Assay

HPLC Messungen

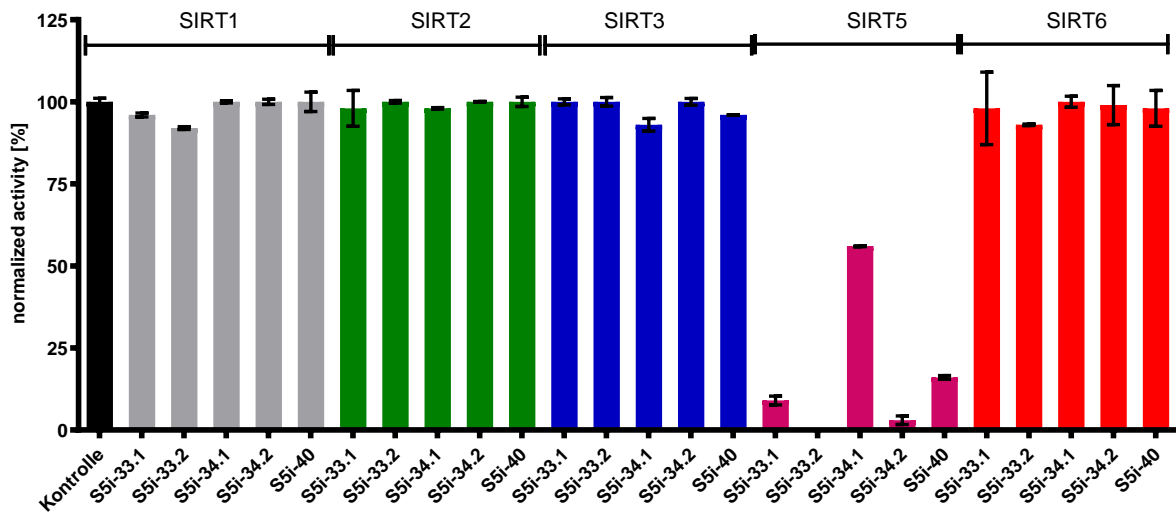


Abbildung S 59: Spezifitätstest verschiedener S5i Peptid-Derivate für SIRT1-3 und 5-6. Für SIRT 1-3 wurde das Substrat Bz-GVLK(Acetyl)EYGV-NH₂ für SIRT Bz-GVLK(Succinyl)EYGV-NH₂ und für SIRT6 Ac-EALPKK(Myristoyl)TCG-NH₂ verwendet.

24h Stabilitäts- und Substrattests

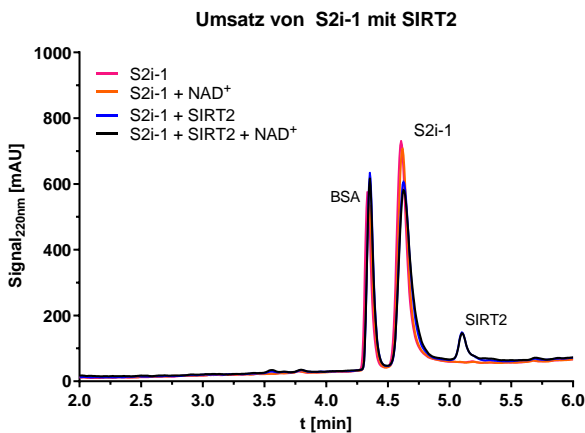


Abbildung S 60: Umsatz chromatogramm von 20 μ M S2i-1 mit 1 μ M SIRT2 nach 24 h bei 37 °C.

Nach dem 24-Stunden-Substrattest erschien bei den Peptid-Derivaten SD-1, SD-2 und SD-3 ein weiterer Peak neben dem Produkt- und dem Substratpeak. Die MS-Analyse zeigt, dass dieser Peak das Substrat mit oxidiertem Schwefel (S=O) ist. Dieser Peak wird mit der Zeit größer, während die Proben auf die Injektion in die 96-Well-Platte warteten. Die Platten konnten nicht luftdicht geschlossen werden, um die Oxidation zu verhindern, darum wurde dieser Peak für die Berechnungen zum Substratpeak dazu addiert.

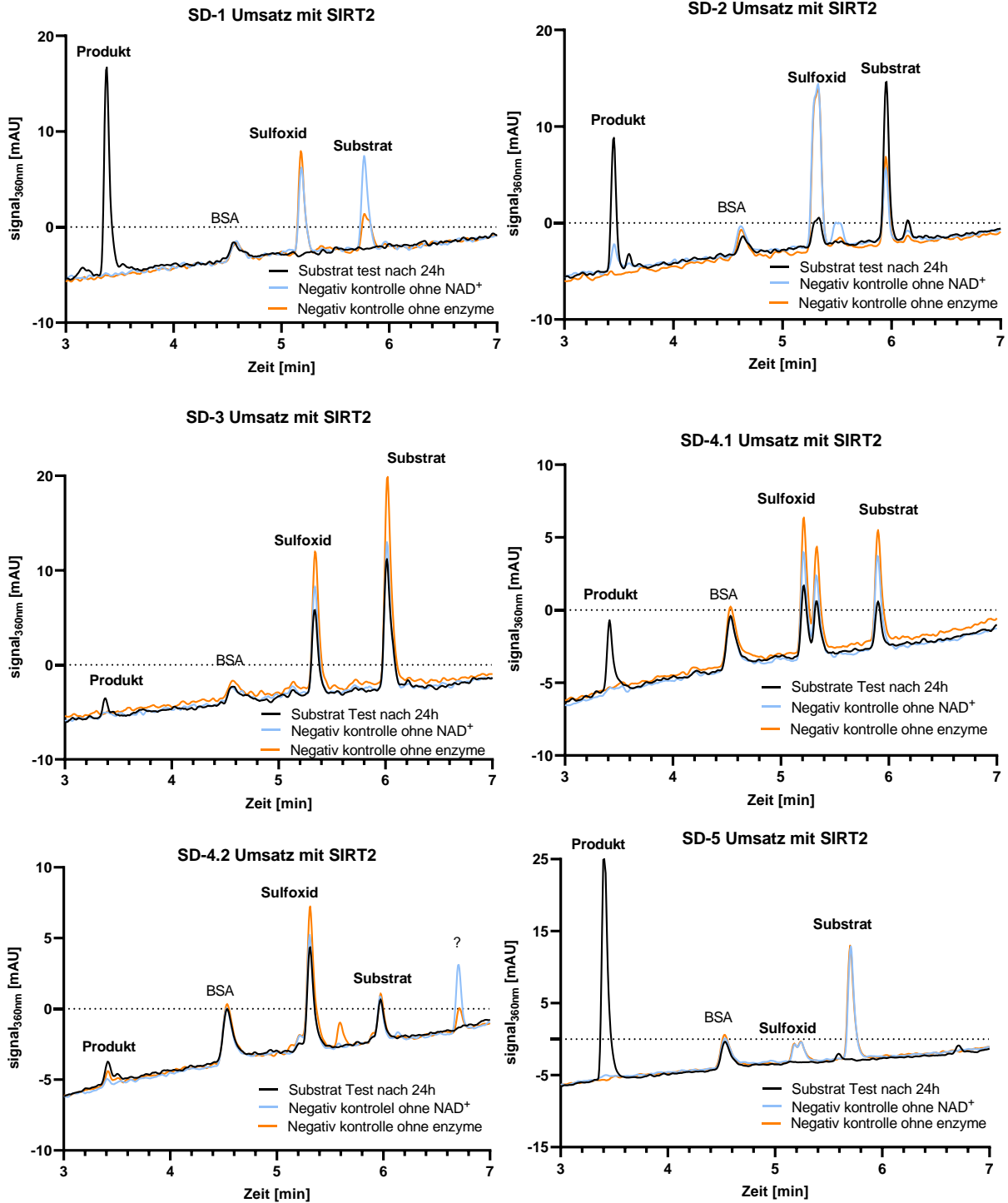


Abbildung S 61: Umsatz von SD-1,2,3,4 und SD-5 nach 24h bei 37°C mit 10µM Peptid-derivat und 1µM SIRT2. Detektiert wurde der Umsatz bei einer Wellenlänge von 360 nm

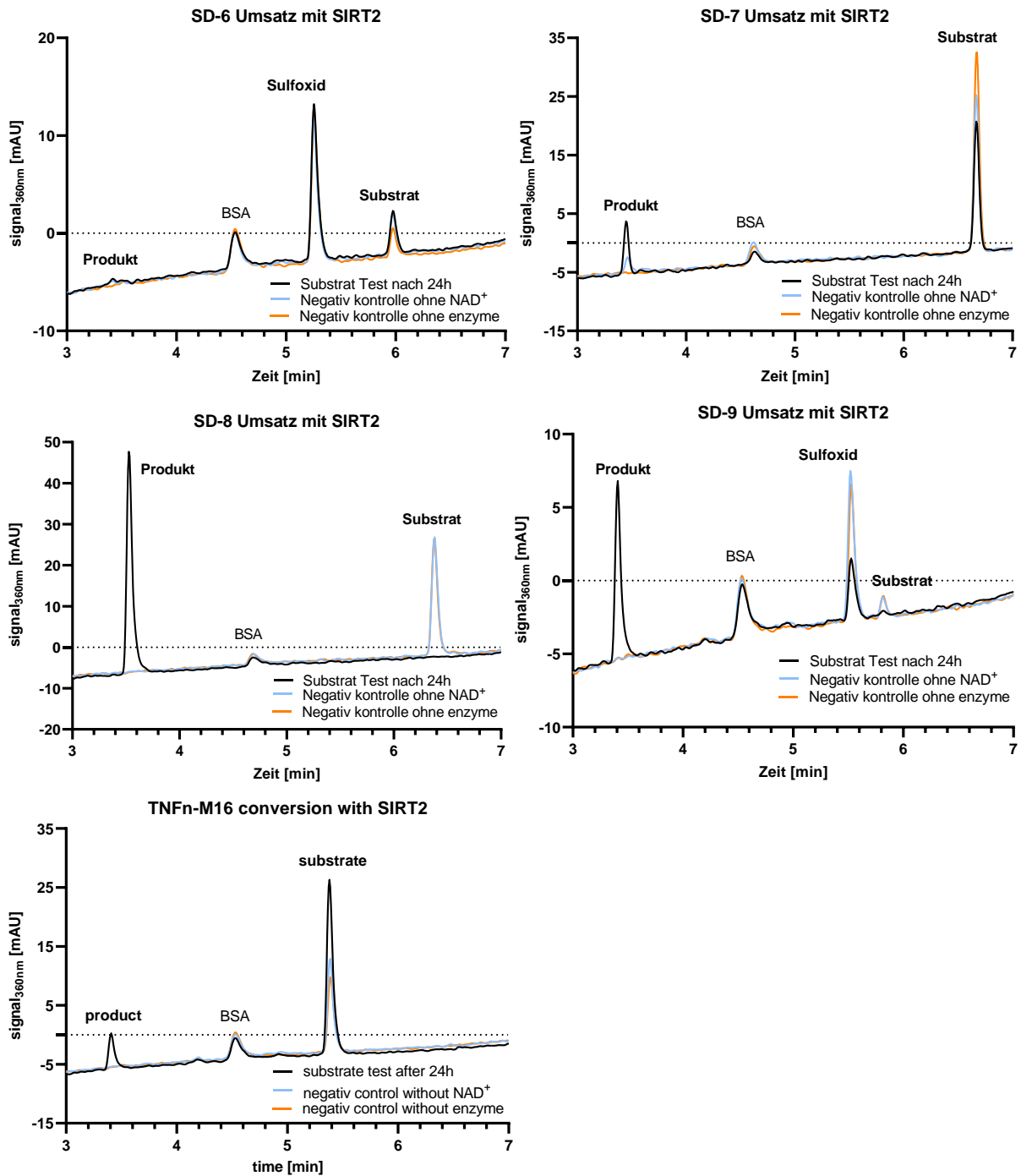


Abbildung S 62 Umsatz von SD-6 bis SD-10 nach 24h bei 37°C mit 10µM Peptid-derivat und 1µM SIRT2. Detektiert wurde der Umsatz bei einer Wellenlänge von 360 nm

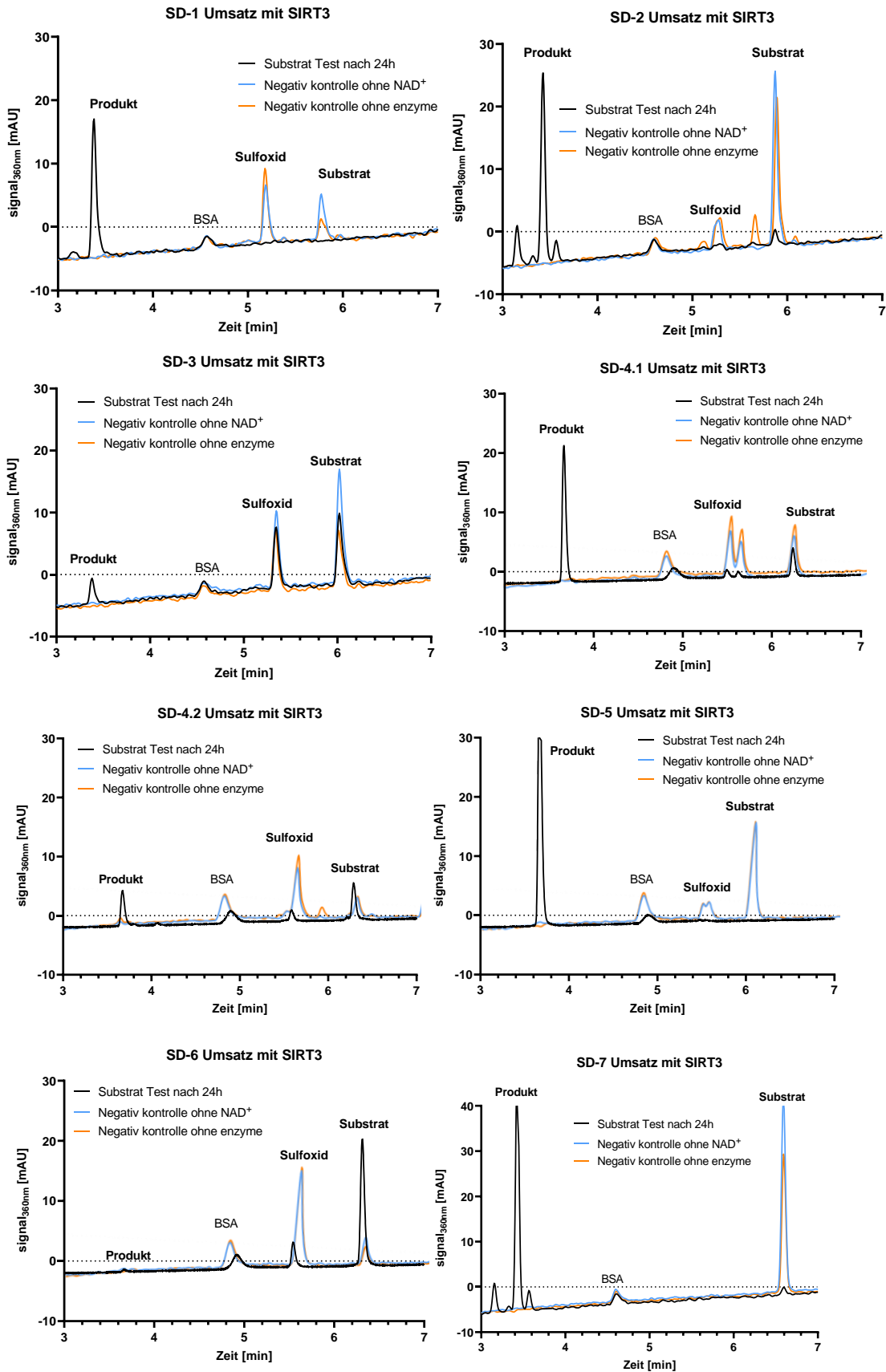


Abbildung S 63: Umsatz von SD-1 bis SD-7 nach 24h bei 37°C mit 10µM peptid-derivat und 1µM SIRT3. Detektiert wurde der Umsatz bei einer Wellenlänge von 360 nm

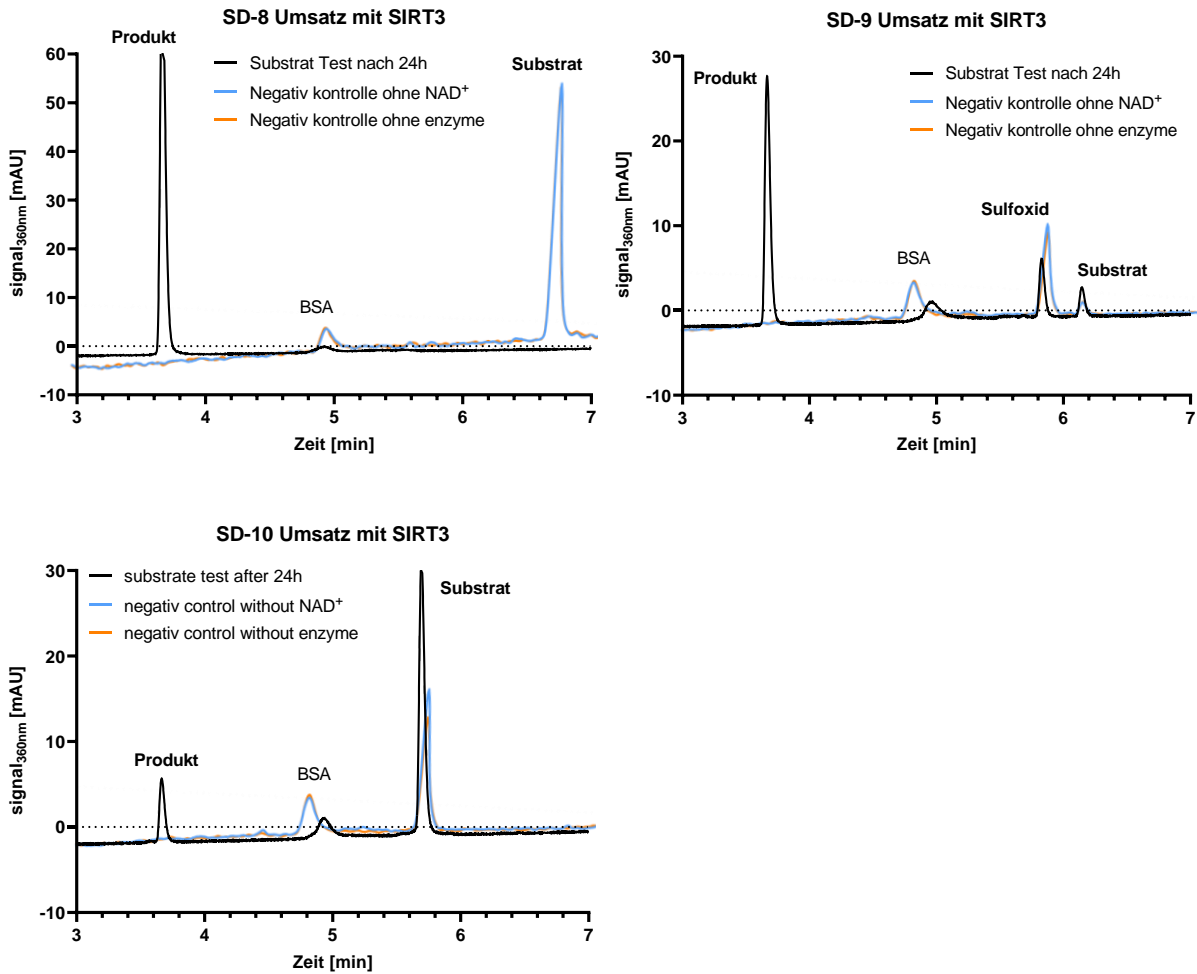


Abbildung S 64: Umsatz von SD-8 bis SD-10 nach nach 24h bei 37°C mit 10µM Peptid-derivat und 1µM SIRT3. Detektiert wurde der Umsatz bei einer Wellenlänge von 360 nm

Kinetiken

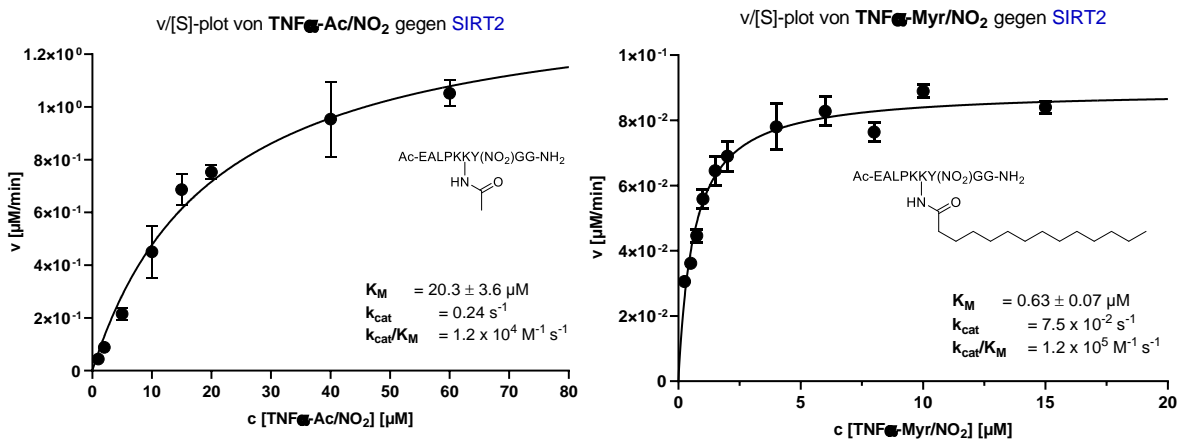


Abbildung S 65 v/[S]-plot von (links):TNF α -Ac/NO₂ gemessen mit 0.1 µM SIRT2 und (rechts): TNF α -Myr/NO₂ gemessen mit 0.02 µM SIRT2.

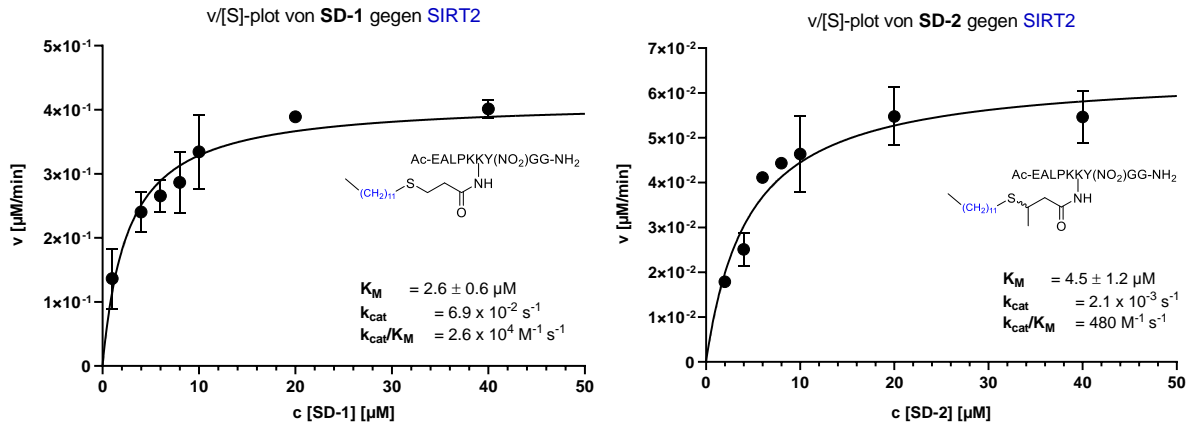


Abbildung S 66: v/[S]-plot von (links): SD-1 gemessen mit 0.1 µM SIRT2 and (rechts): SD-2 gemessen mit 0.5 µM SIRT2.

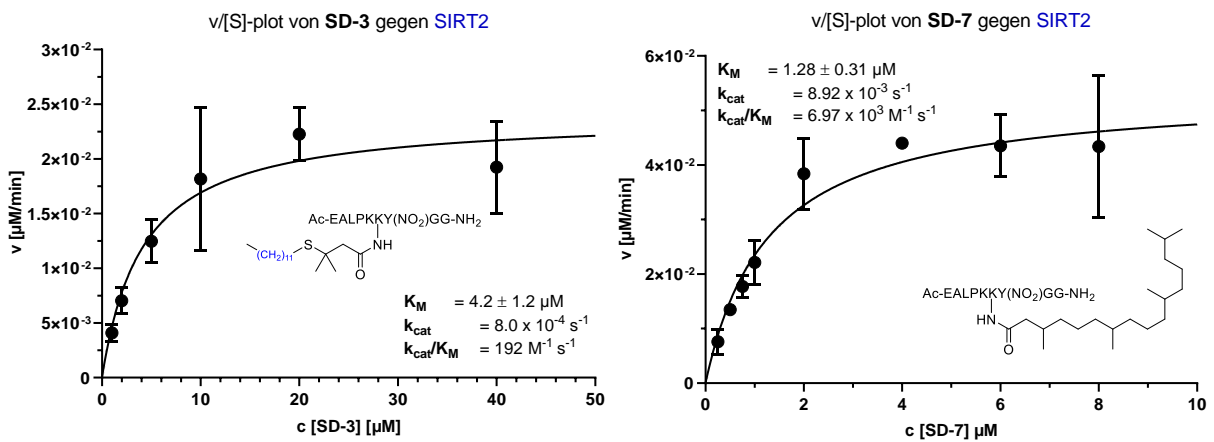


Abbildung S 67: v/[S]-plot von (links): SD-3 gemessen mit 0.5 µM SIRT2 and (rechts): SD-7 gemessen mit 0.1 µM SIRT2.

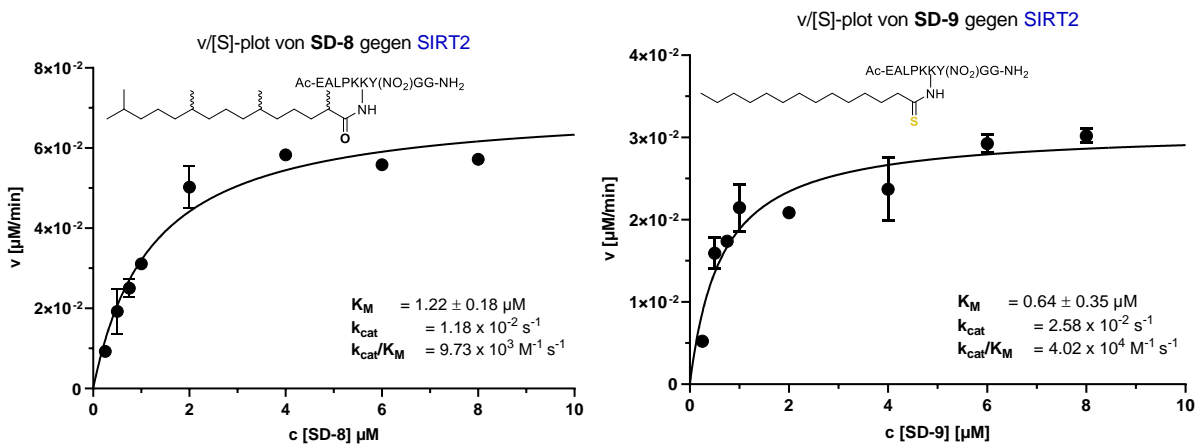


Abbildung S 68: v/[S]-plot von (links): SD-8 gemessen mit 0.1 µM SIRT2 and (rechts): SD-9 gemessen mit 0.02 µM SIRT2.

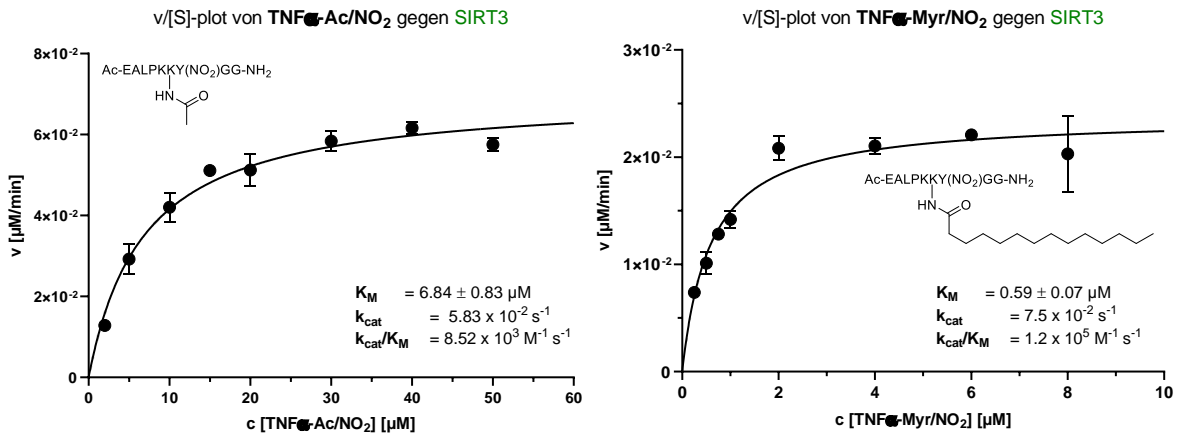


Abbildung S 69: v/[S]-plot von (links):TNF α -Ac/NO₂ gemessen mit 0.02 μM SIRT3 and (rechts): TNF α -Myr/NO₂ gemessen mit 0.005 μM SIRT3.

IC₅₀ Messungen

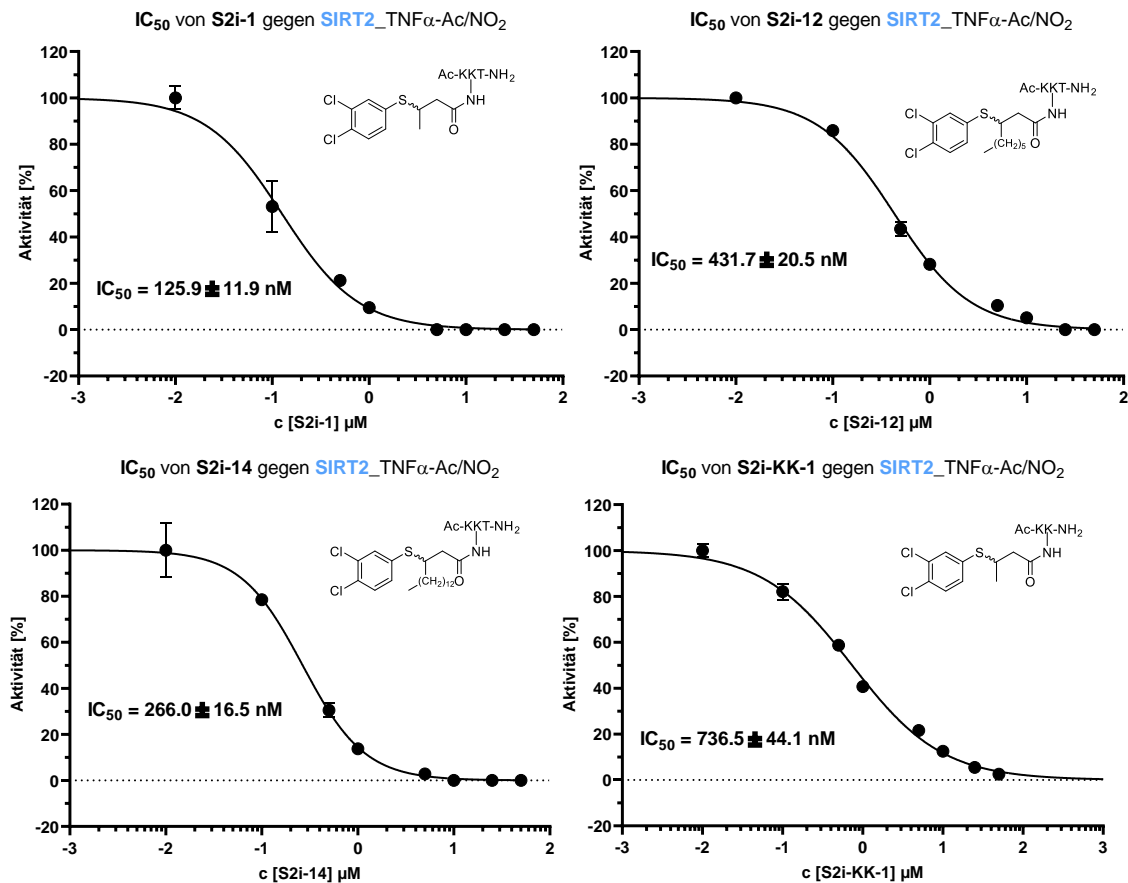
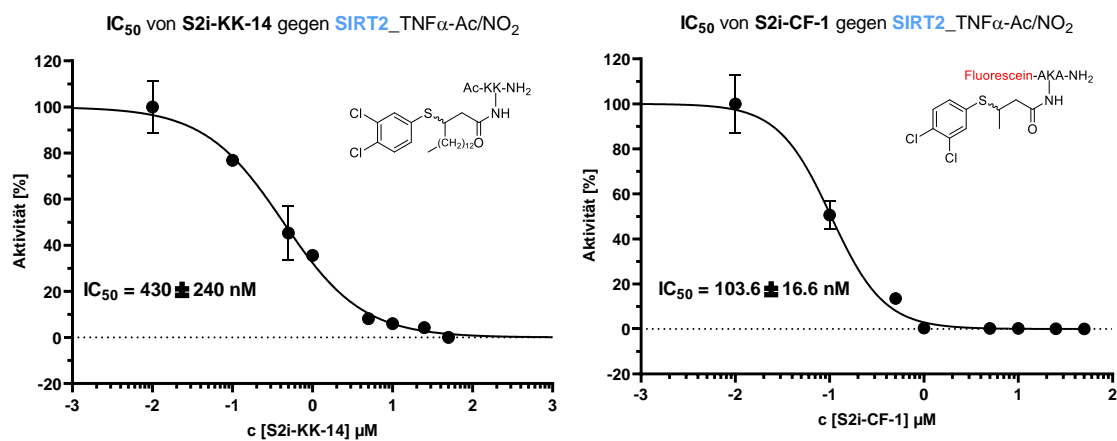
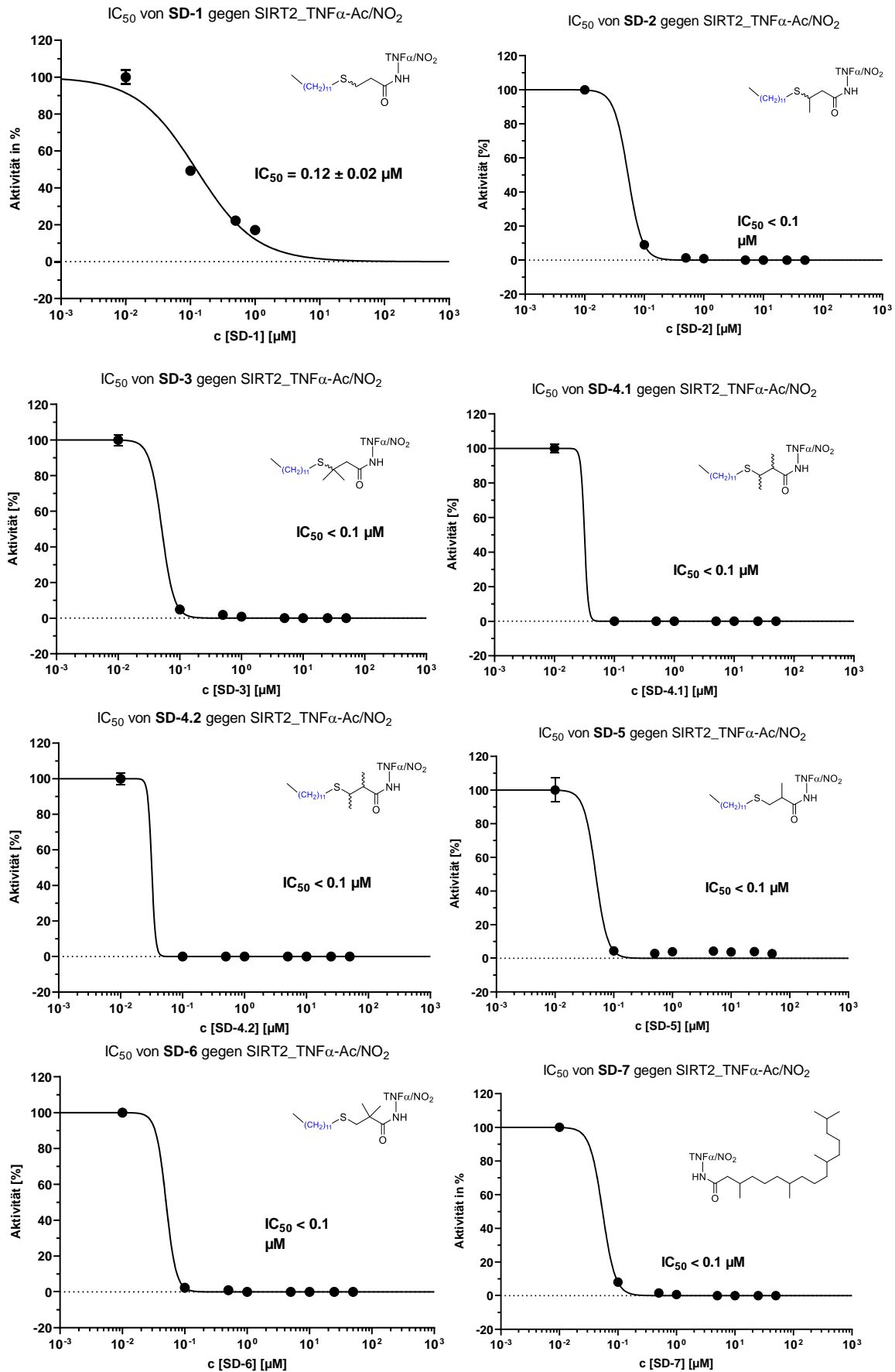


Abbildung S 70: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S2i-1, S2i-12, S2i-14, S2i-KK-1, gegen SIRT2, und TNF α -Ac/NO₂

Abbildung S 71: IC₅₀ Kurven der Peptid-Derivate S2i-KK-14 und S2i-CF-1 gegen SIRT2, und TNFα-Ac/NO₂Tabelle S 3: IC₅₀ Werte der Peptid-Derivate gegen TNFα-Ac/NO₂ und TNFα-Myr/NO₂, gemessen mit HPLC

| Inhibitor | IC ₅₀ gegen TNFα-Ac/NO ₂ | IC ₅₀ gegen TNFα-Myr/NO ₂ |
|-----------|--|---|
| SD-1 | 0.12 ± 0.02 μM | > 50 μM |
| SD-2 | < 0.1 μM | 1.31 ± 0.07 |
| SD-3 | < 0.1 μM | 1.07 ± 0.23 |
| SD-4.1 | < 0.1 μM | 0.54 ± 0.03 |
| SD-4.2 | < 0.1 μM | 0.48 ± 0.25 |
| SD-5 | < 0.1 μM | 2.69 ± 0.25 |
| SD-6 | < 0.1 μM | 1.10 ± 0.09 |
| SD-7 | < 0.1 μM | 1.02 ± 0.26 |
| SD-8 | < 0.1 μM | 2.69 ± 0.32 |
| SD-9 | < 0.1 μM | 0.22 ± 0.02 |
| SD-10 | < 0.1 μM | 16.81 ± 2.22 |
| SD-KKT-2 | < 0.1 μM | 1.31 ± 0.07 μM |
| SD-KKT-2a | 0.55 ± 0.03 μM | 6.26 ± 1.34 μM |
| SD-KKT-2b | 1.77 ± 0.06 μM | > 50 μM |
| SD-KK-1 | 0.87 ± 0.06 μM | > 50 μM |
| SD-KK-2 | < 0.1 μM | 4.72 ± 0.48 μM |
| SD-KK-2b | 1.40 ± 0.17 μM | > 50 μM |
| SD-KK-3 | < 0.1 μM | 3.94 ± 0.12 μM |
| SD-KK-7 | < 0.1 μM | 1.31 ± 0.55 |
| SD-K-2 | 0.11 ± 0.03 μM | > 50 μM |
| SD-CF-2 | < 0.1 μM | 0.38 ± 0.08 |

Abbildung S 72: IC₅₀ Werte der Peptid-derivate SD-1 bis SD-7 gegen TNFα-Ac/NO₂ gemessen mit 0.1 μM SIRT2

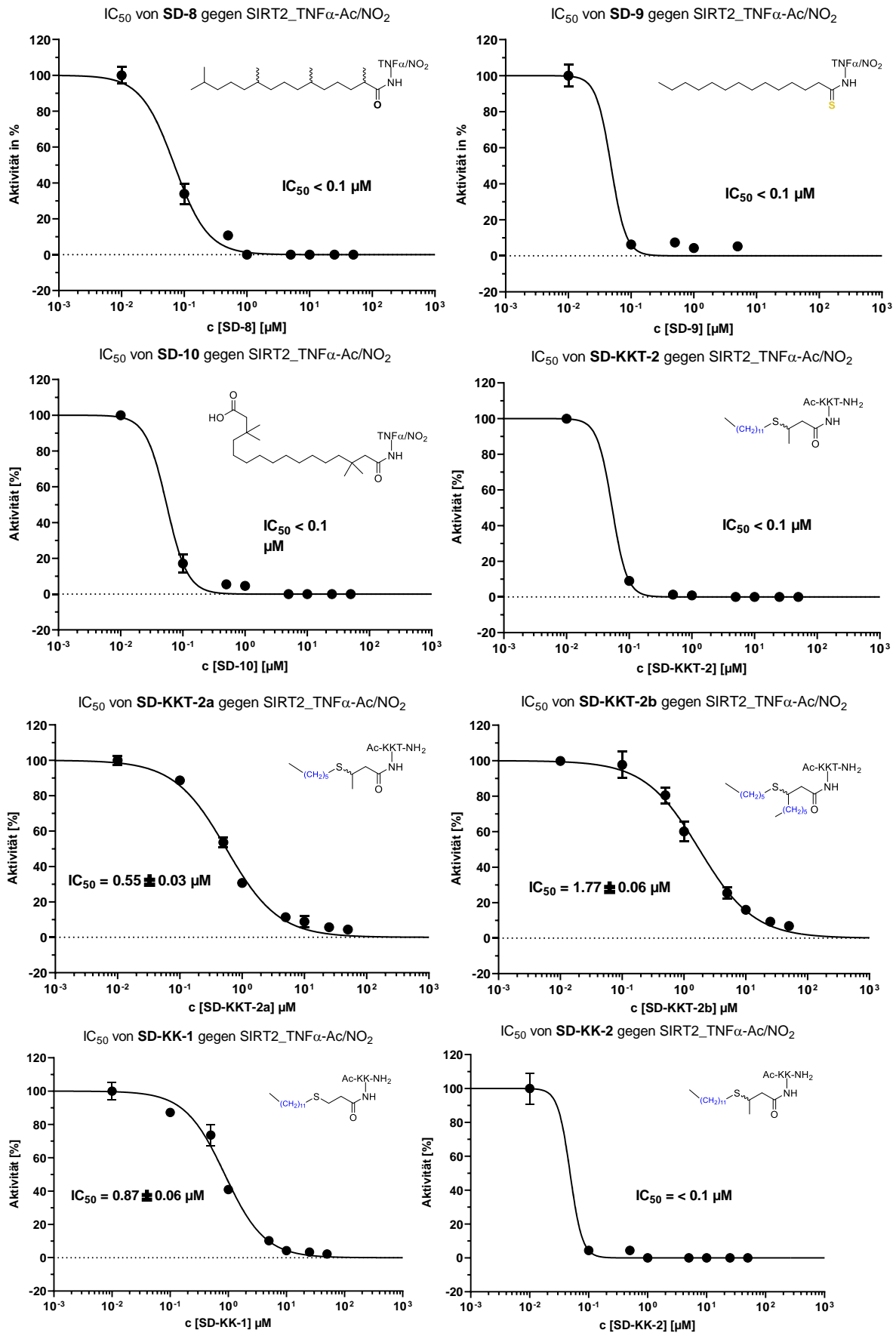
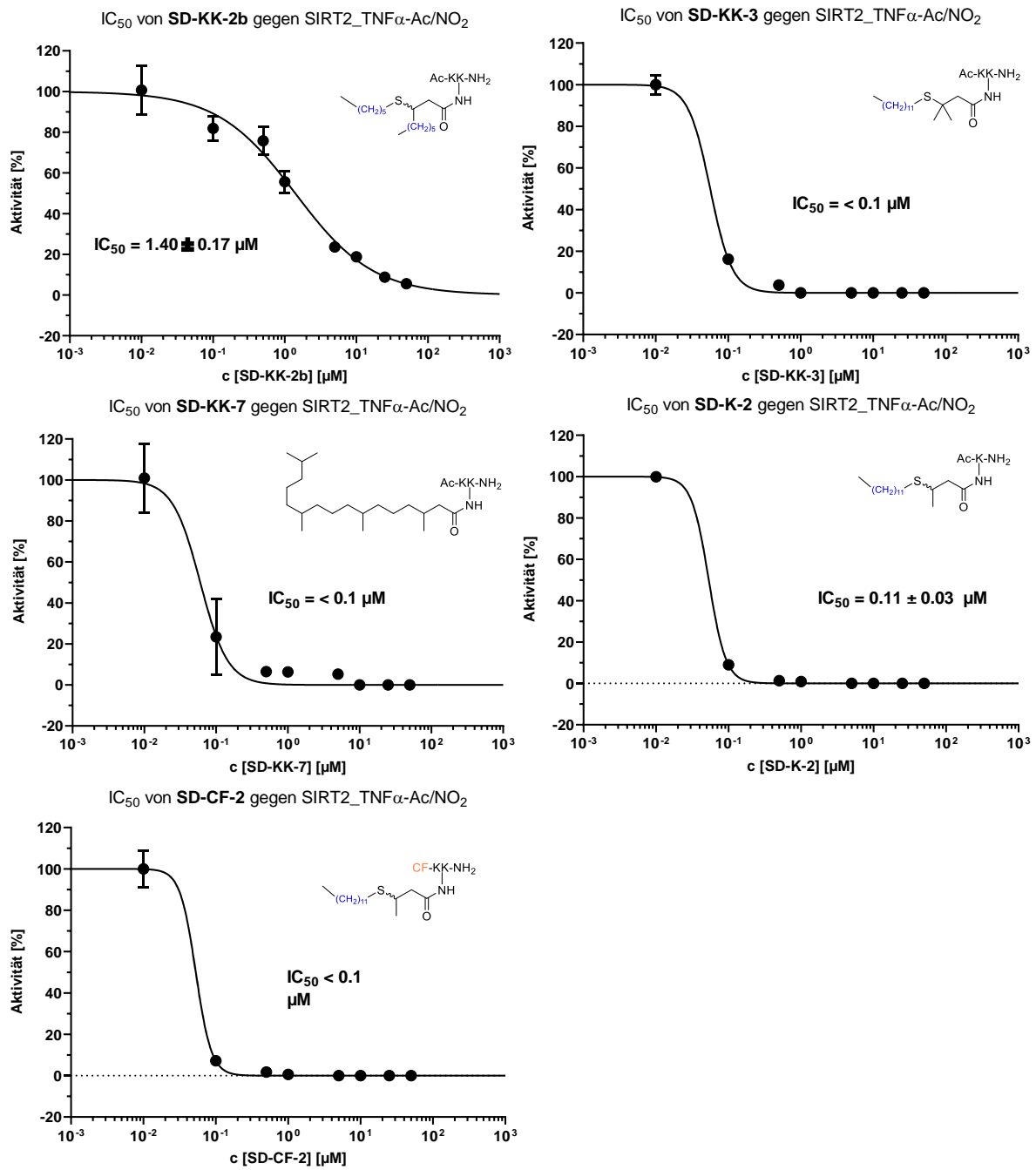
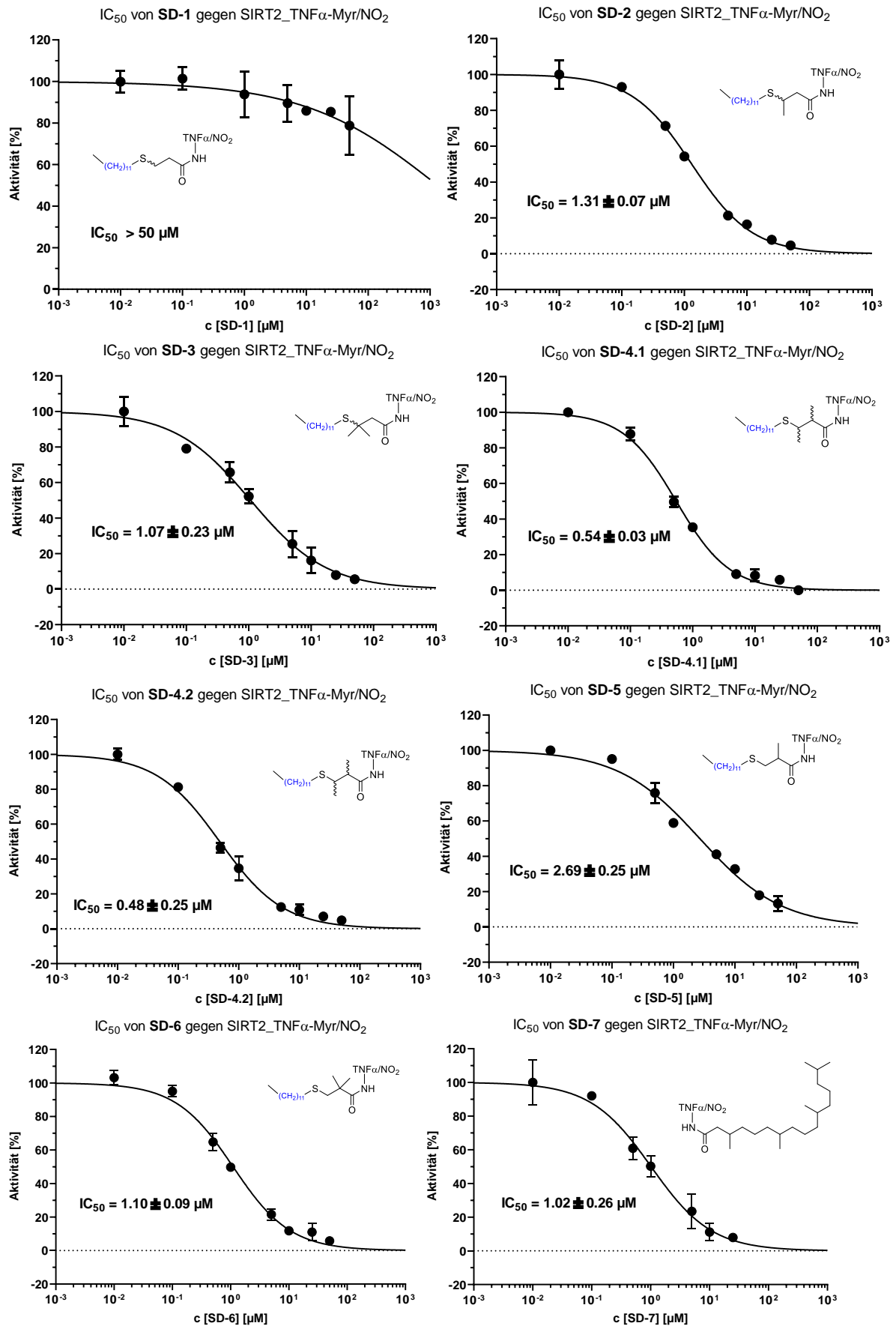
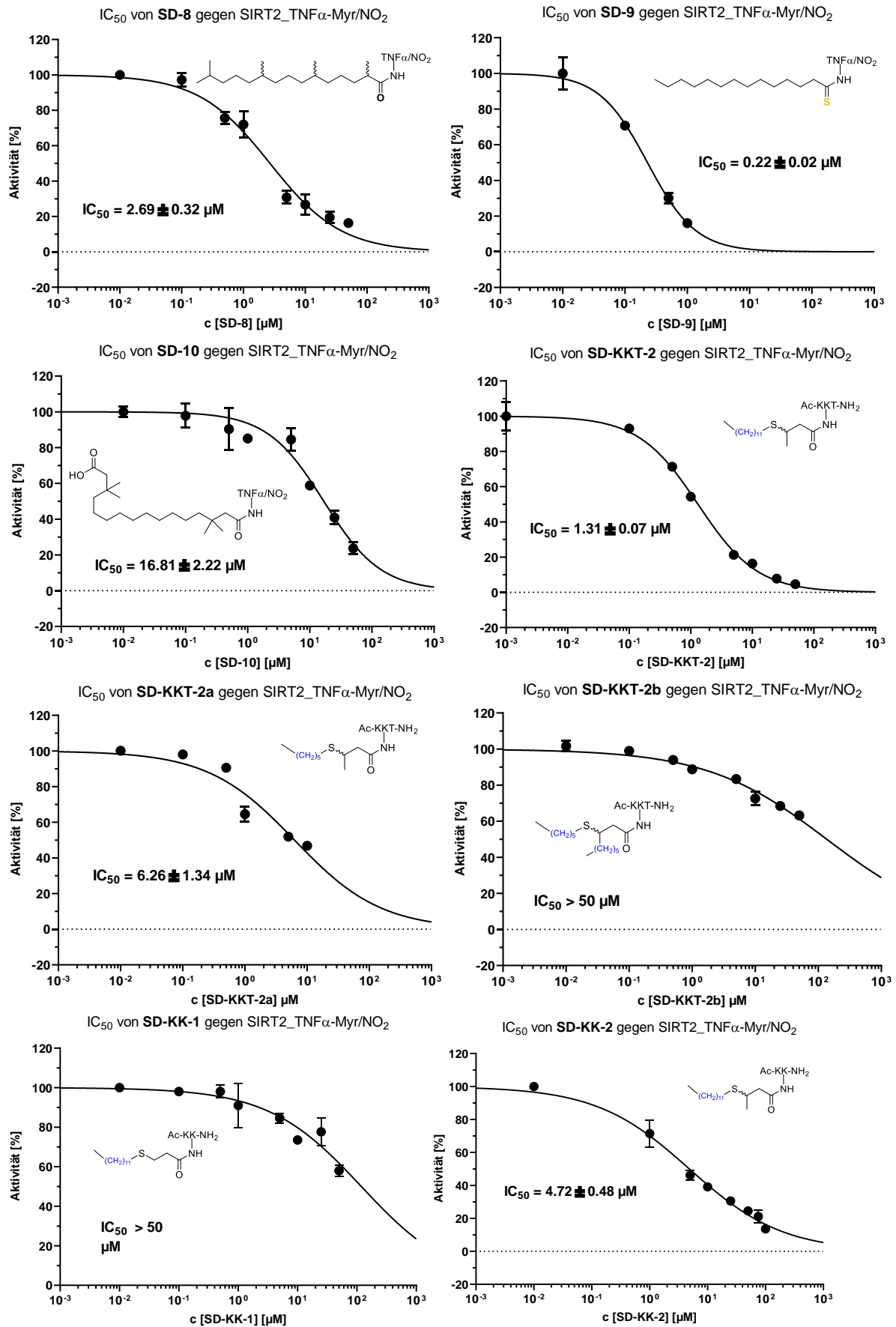
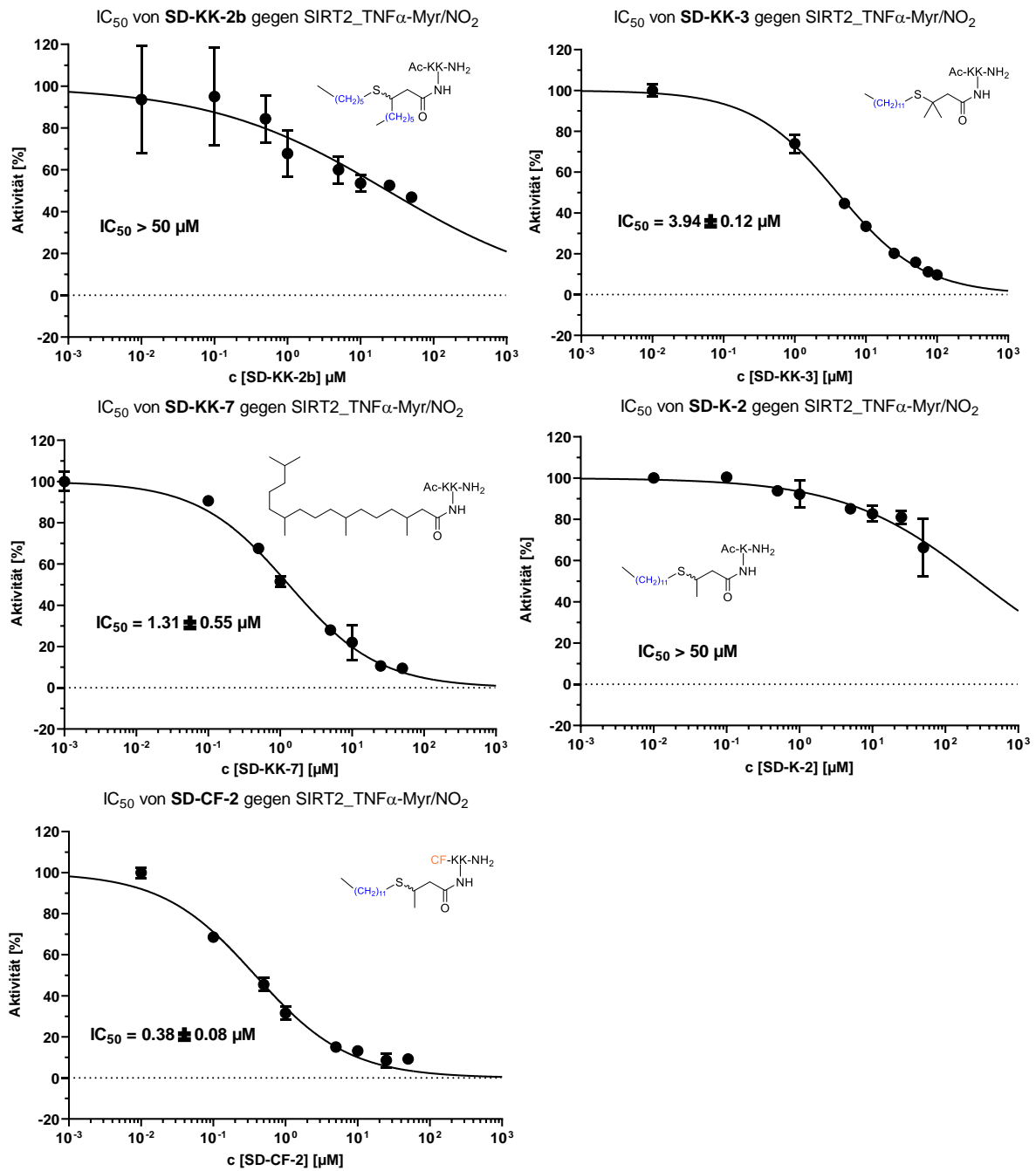


Abbildung S 73: IC₅₀ Werte der Peptid-derivate SD-8 bis SD-KK-2 gegen TNF α -Ac/NO₂ gemessen mit 0.1 μ M SIRT2

Abbildung S 74: IC₅₀ Werte der Peptid-derivate SD-KK-2b bis SD-CF-2 gegen TNF α -Ac/NO₂ gemessen mit 0.1 μ M SIRT2



Abbildung S 76: IC₅₀ Werte der Peptid-derivate SD-8 bis SD-KK-2 gegen TNF α -Myr/NO₂ gemessen mit 0.1 μM SIRT2

Abbildung S 77: IC₅₀ Werte der Peptid-derivate SD-KK-2b bis SD-CF-2 gegen TNFα-Myr/NO₂ gemessen mit 0.1 μM SIRT2

MST Messungen

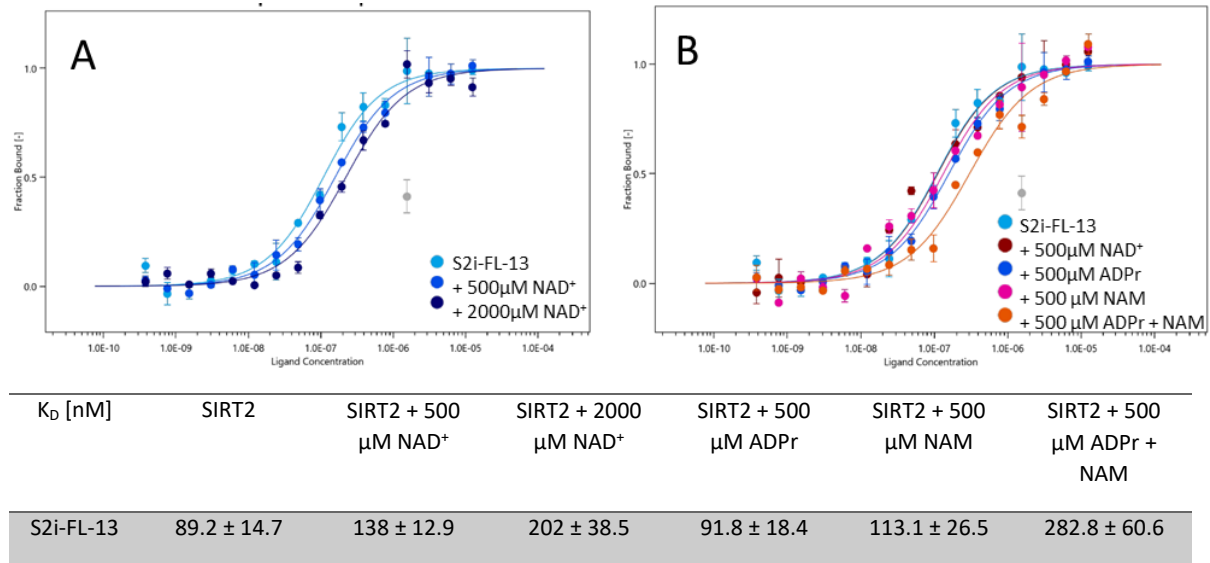


Abbildung S 78: Bindungsversuch mit MST : **[A]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivaten für SIRT2 in Abwesenheit von NAD⁺ (hellblau) und in Gegenwart von 500 μ M (mittelblau) und 2000 μ M (dunkelblau) NAD⁺ um das 2-fache verschlechtert **[B]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **S2i-CF-13** für SIRT2 in Abwesenheit von NAD⁺, NAM und ADP-Ribose (hellblau), in Anwesenheit von NAD⁺ (mittelblau), in Anwesenheit von ADP-Ribose (rot), in Anwesenheit von NAM (magenta) und in Anwesenheit von ADP-Ribose und NAM zusammen (orange) Die Geschwindigkeitskonstante von S2i-FL-13 hat sich mit NAD⁺, mit NAM und mit ADPr + NAM verschlechtert. Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

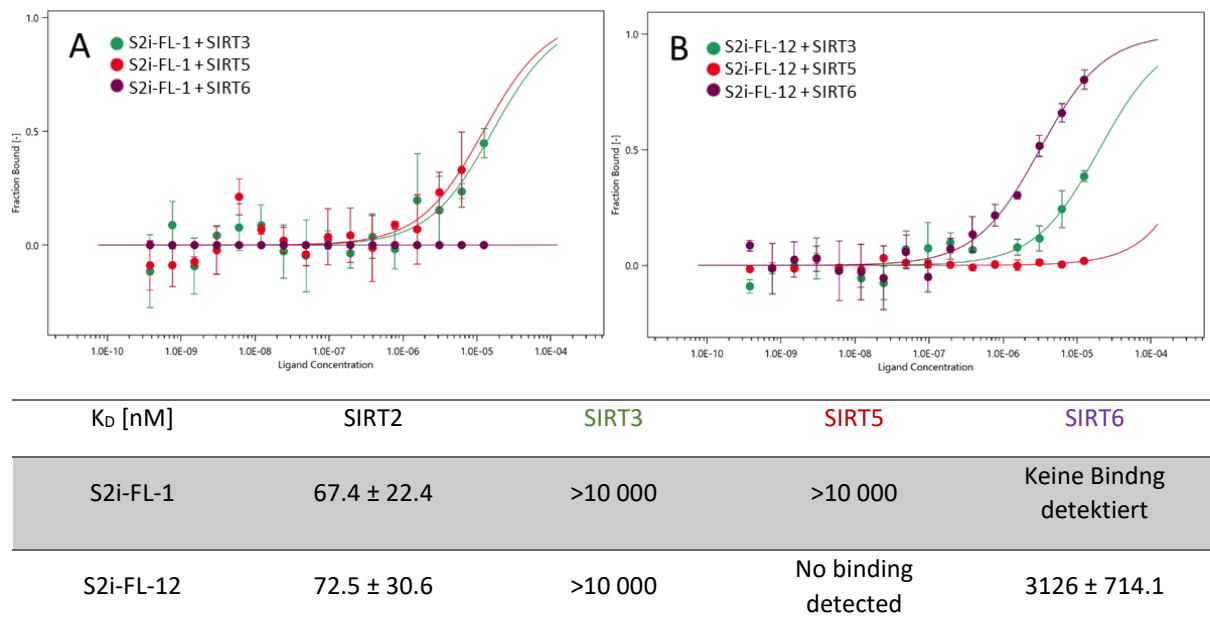


Abbildung S 79: Bindungsversuch mit MST: **[A]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **S2i-CF-1** für SIRT3 (grün), SIRT5 (rot) und SIRT6 (violett). **[B]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **S2i-CF-12** für SIRT3 (grün), SIRT5 (rot) und SIRT6 (violett) Nano-BLUE-Anregungsleistung 80 % (S2i-CF-1) oder 40 % (S2i-CF-12), MST-Leistung 40 %)

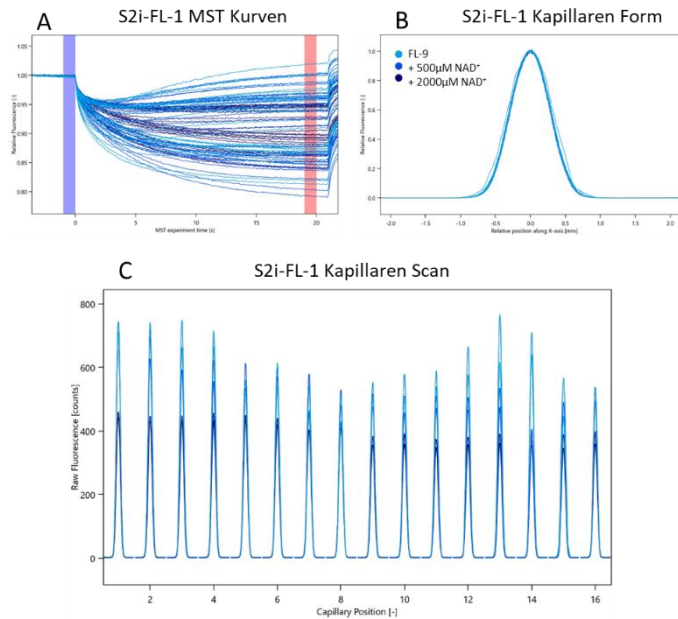


Abbildung S 80: MST-Analysebericht für die Verbindung **S2i-FL-1** ohne und mit NAD⁺ **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung (Nano-BLUE-Anregungsleistung 80 %, MST-Leistung 40 %)

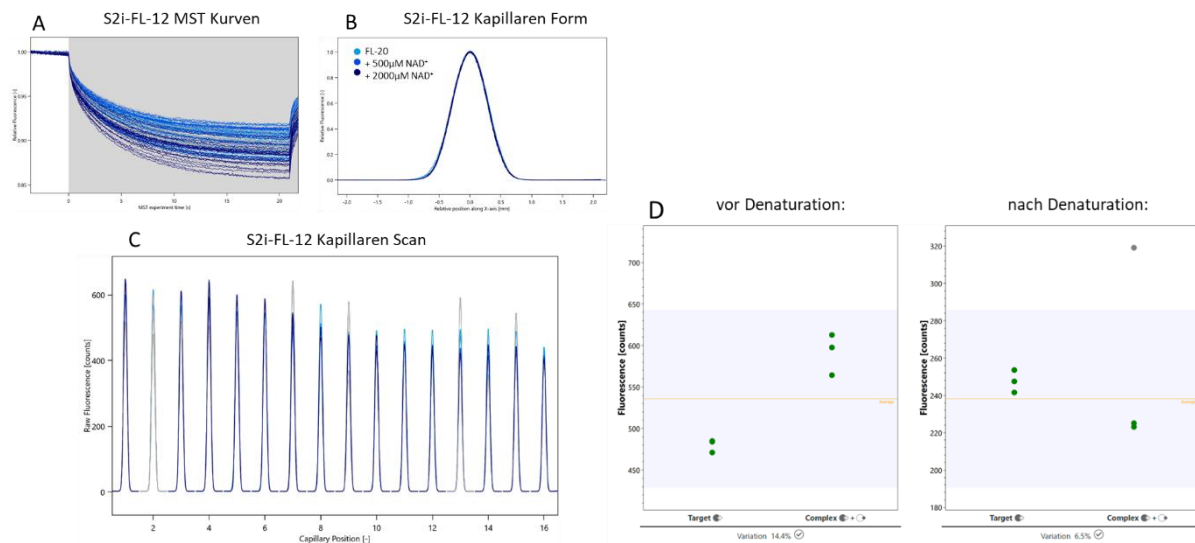


Abbildung S 81: MST-Analysebericht für die Verbindung **S2i-FL-12** ohne und mit NAD⁺: **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Kapillarform zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt anfängliche Fluoreszenzänderung **[D]** SD-Test der Verbindung S2i-FL-12 zeigt, dass die anfängliche Fluoreszenzänderung ligandeninduziert ist. (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

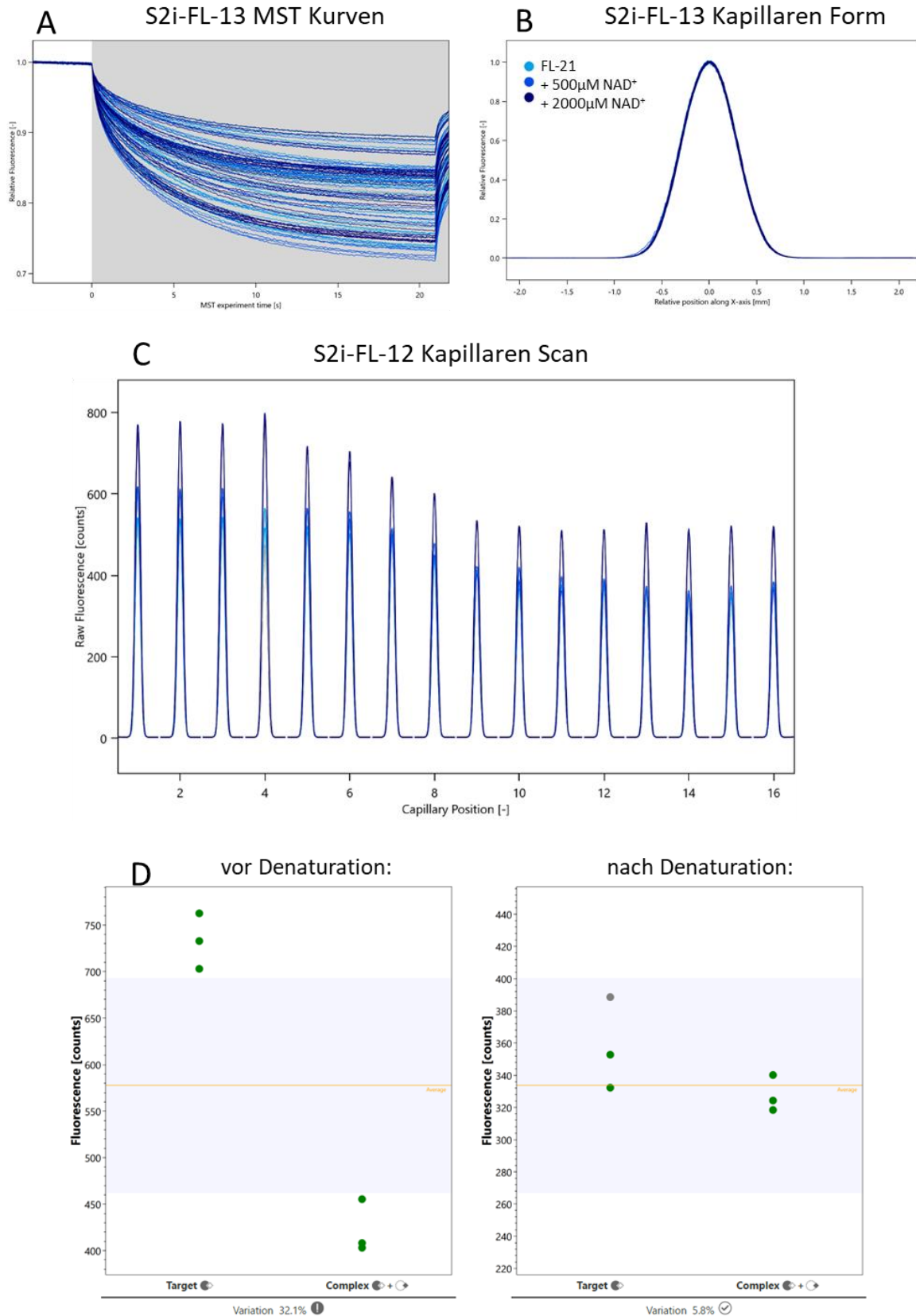
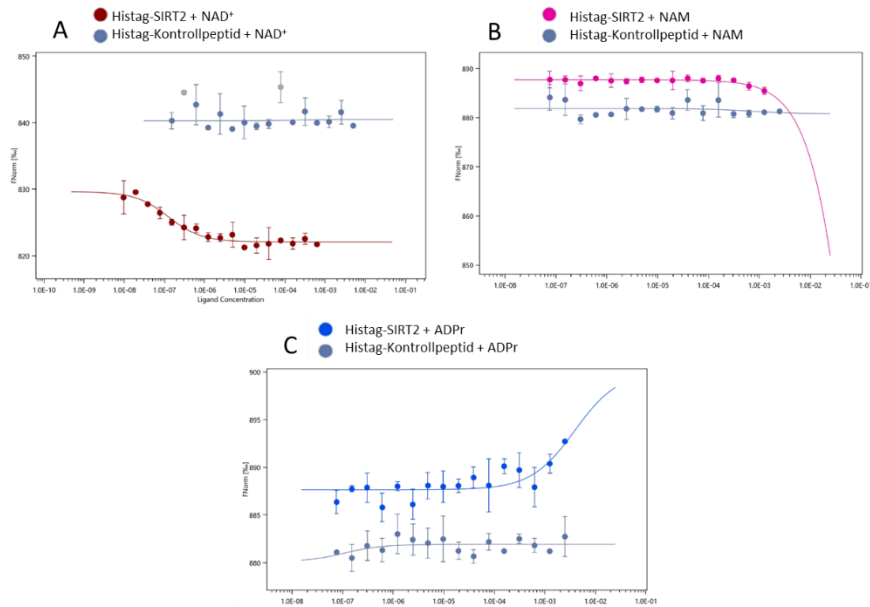


Abbildung S 82: MST-Analysebericht für die Verbindung **S2i-FL-13** ohne und mit NAD^+ : **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt anfängliche Fluoreszenzveränderung **[D]** SD-Test der Verbindung **S2i-FL-13** zeigt, dass die anfängliche Fluoreszenzveränderung durch den Liganden verursacht wird. (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)



| K _D [nM] | NAD ⁺ | NAM | ADPr |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Histag-SIRT2 | 112.3 ± 30.9 nM | > 120 x10 ⁶ nM | 3.9 x10 ⁶ nM |
| Histag-Kontrollpeptid | Keine Bindung detektiert | Keine Bindung detektiert | Keine Bindung detektiert |

Abbildung S 83: Bindungsexperiment mit MST von markiertem SIRT2 **[A]** Die Bindungskurve von SIRT2 gegen NAD⁺ zeigt einen K_D-Wert von 112.3 ± 30.9 nM. **[B]** Die Bindungskurve von SIRT2 gegen NAM zeigt eine schwache Bindung mit über > 120 x10⁶ nM. **[C]** Die Bindungskurve von SIRT2 gegen ADPr zeigt einen K_D-Wert von 3.9 x10⁶ nM. (Nano-RED-Anregungsleistung 60 %, MST-Leistung 60 %) NAD⁺. NAM und ADPr zeigen keine Bindung mit dem Kontrollpeptid.

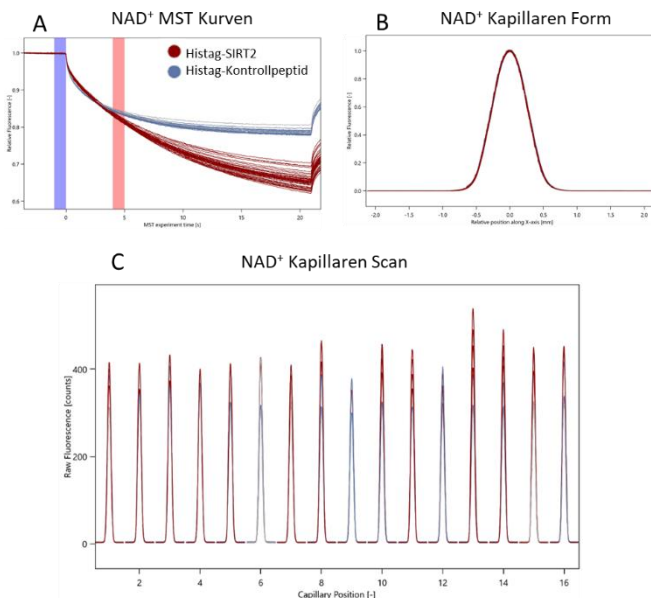


Abbildung S 84: MST-Analysebericht für markiertes SIRT2 und Kontrollpeptid gegen NAD⁺ **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung (Nano-RED-Anregungsleistung 60 % für SIRT2 und 100 % für Kontrollpeptid, MST-Leistung 60 %)

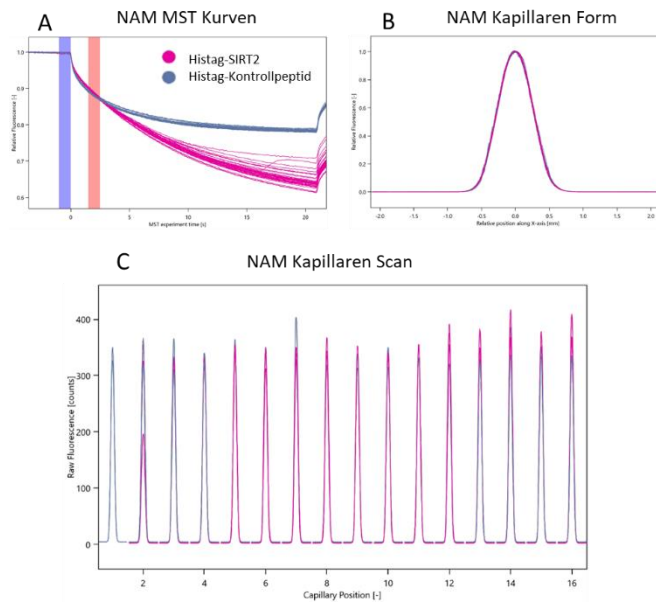


Abbildung S 85: MST-Analysebericht für markiertes SIRT2 und Kontrollpeptid gegen NAM **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung (Nano-RED-Anregungsleistung 60 % für SIRT2 und 100 % für Kontrollpeptid, MST-Leistung 60 %)

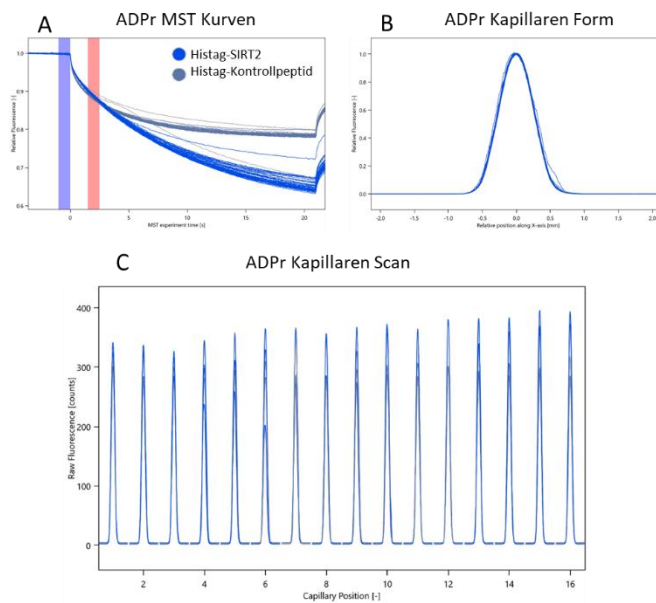


Abbildung S 86: MST-Analysebericht für markiertes SIRT2 und Kontrollpeptid gegen ADPr **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung (Nano-RED-Anregungsleistung 60 % für SIRT2 und 100 % für Kontrollpeptid, MST-Leistung 60 %)

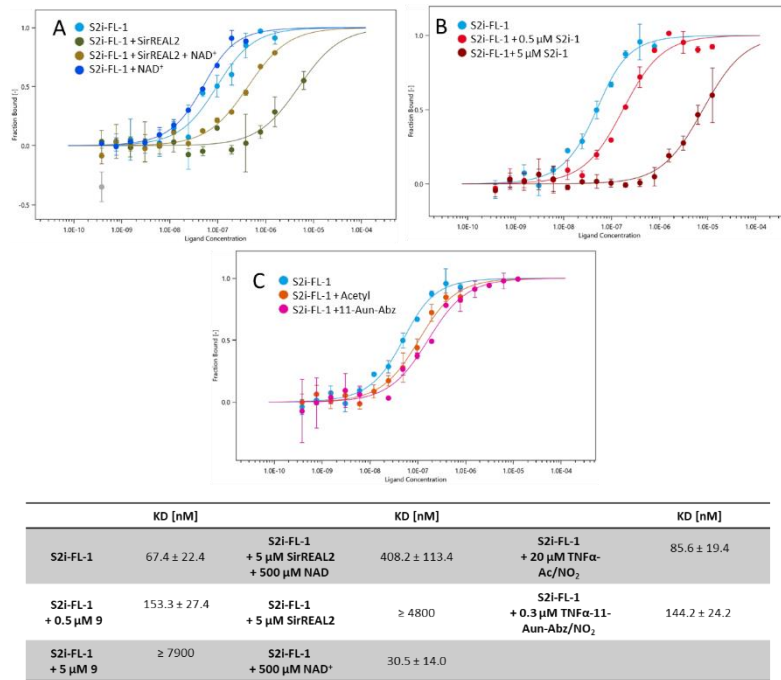


Abbildung S 87: Bindungsexperiment mit MST: **[A]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **S2i-CF-1** für SIRT2 allein (hellblau), in Gegenwart von 500 µM NAD⁺ (mittelblau), in Gegenwart von 5 µM SirREAL2 (olivgrün) und in Gegenwart von 5 µM SirREAL2 und 500 µM NAD⁺ (gelbgrün) Die Geschwindigkeitskonstante von **S2i-CF-1** hat sich mit 5 µM SirREAL2 um das 70-fache und mit SirREAL2 und NAD⁺ zusammen um das 6-fache verschlechtert. **[B]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivaten für SIRT2 allein (hellblau), in Gegenwart von 0.5 µM Peptid-Derivat **S2i-1** (rot) und in Gegenwart von 5 µM Peptid-Derivat **S2i-11** (dunkelrot) **[C]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **S2i-CF-1** für SIRT2 allein (hellblau), in Gegenwart von 20 µM TNFα-Acetyl/NO₂ (orange) und in Gegenwart von 0.3 µM TNFα-11-Aun-Abz/NO₂ (Magenta)

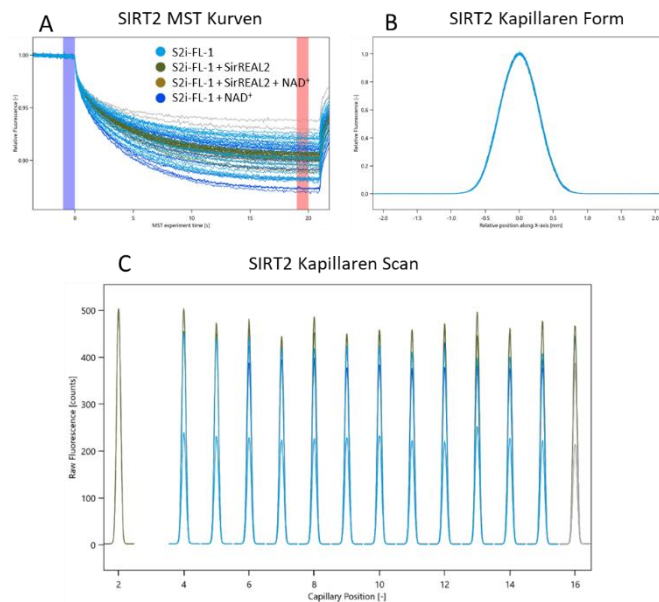


Abbildung S 88: MST-Analysebericht für die Verbindung **S2i-CF-1** ohne und mit SirREAL2 und NAD⁺: **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt kein anfängliche Fluoreszenzänderung (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

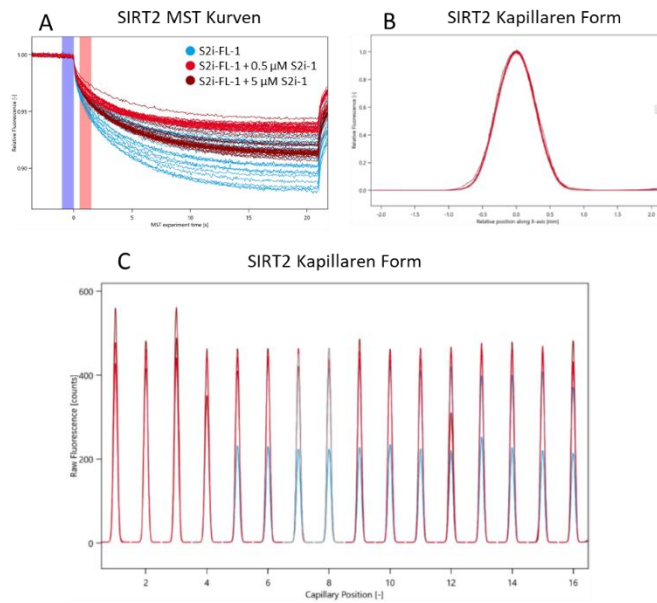


Abbildung S 89: MST-Analysebericht für Peptid-Derivat **S2i-CF-1** ohne und mit Peptid-Derivat **S2i-1** in verschiedenen Konzentrationen **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt kein anfängliche Fluoreszenzveränderung. (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %).

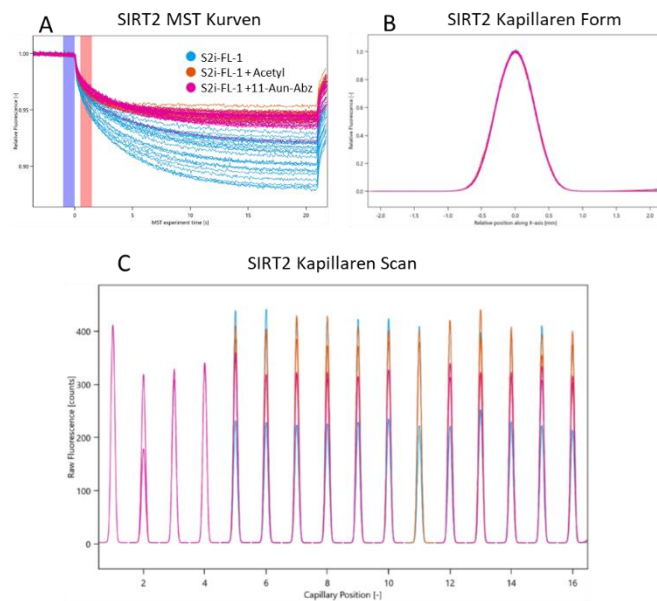


Abbildung S 90: MST-Analysebericht für das Peptid-Derivat **S2i-CF-1** ohne und mit TNF α -Acetyl/NO $_2$ oder TNF α -11-Aun-Abz/NO $_2$ **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt anfängliche Fluoreszenzveränderung (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

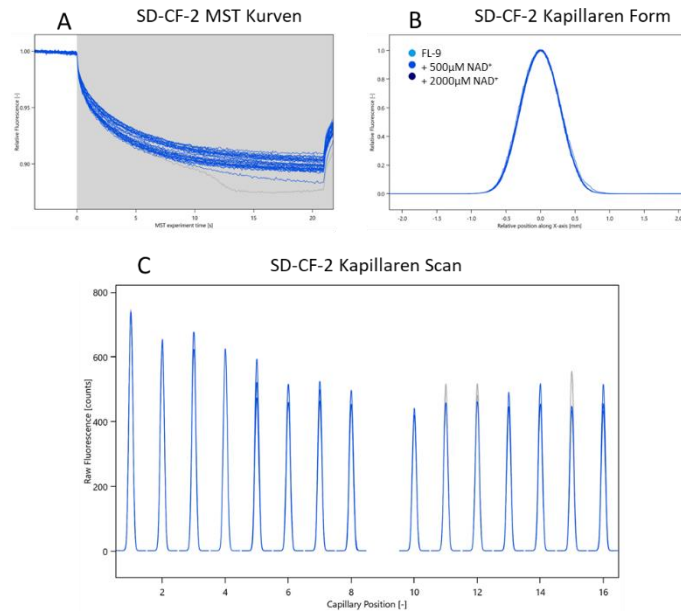


Abbildung S 91 MST-Analysebericht für die Verbindung **SD-CF-2** gegen **SIRT2** **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt eine anfängliche Fluoreszenzänderung, daher wurde Die K_D Kurve über diese Änderung bestimmt (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

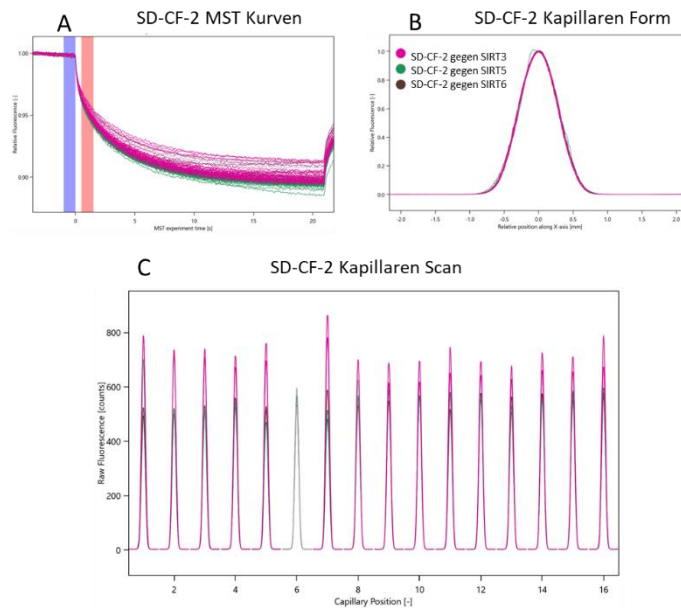
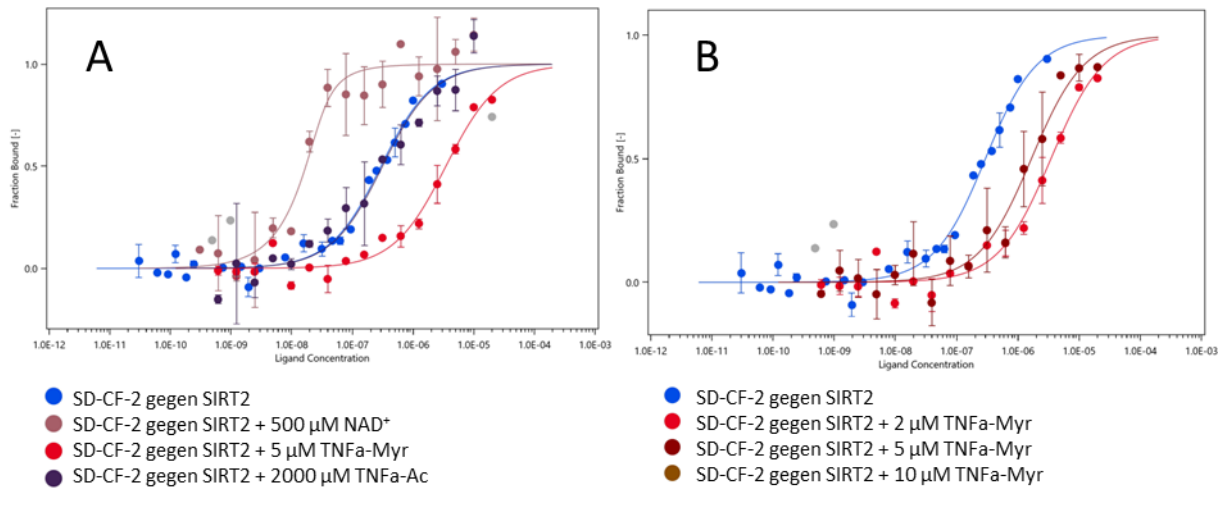


Abbildung S 92: MST-Analysebericht für die Verbindung **SD-CF-2** gegen **SIRT3**, **SIRT5** und **SIRT6** **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung, (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)



| KD [nM] | SIRT2 | SIRT2 + 500 μM NAD ⁺ | SIRT2 + 2000 μM TNFa-Ac | SIRT2 + 2 μM TNFa-Myr | SIRT2 + 5 μM TNFa-Myr | SIRT2 + 10 μM TNFa-Myr |
|---------|------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| SD-CF-2 | 275 ± 41.0 | 3.8 ± 4.4 | 292 ± 91.0 | 1646 ± 412.9 | 3457 ± 837.0 | Keine Bindung detektiert |

Abbildung S 93: Verdrängungsexperiment mit MST: **[A]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **SD-CF-2** für SIRT2 (Blau) für SIRT2 + 500 μM NAD⁺ (Pflaume), SIRT2 + 5 μM TNFa-Myr (Rot) und SIRT2 + 2000 μM TNFa-Ac (Dunkelblau) **[B]** Dosis-Wirkungs-Analyse von Fluorescein-markierten Derivat **SD-CF-2** für SIRT2 (Blau) für SIRT2 + 2 μM TNFa-Myr (Rot), SIRT2 + 5 μM TNFa-Myr (Dunkelrot) und SIRT2 + 10 μM TNFa-Myr (Pflaume) Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 % und MST-Leistung 40

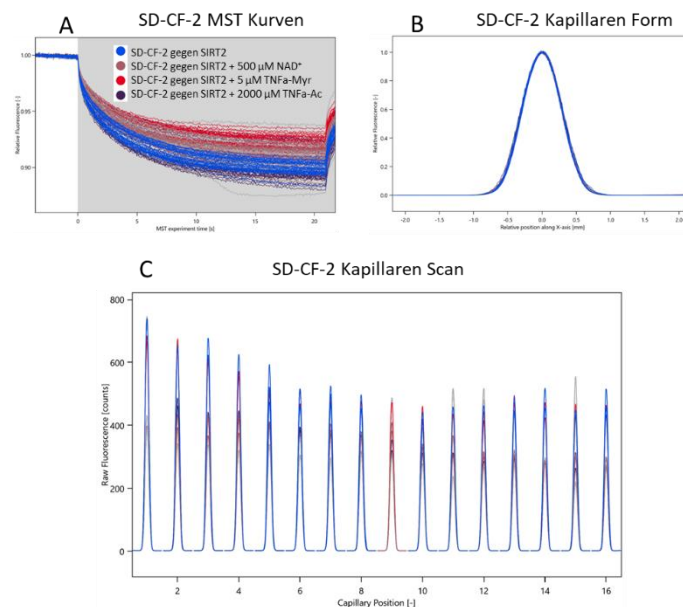


Abbildung S 94: MST-Analysebericht für die Verbindung **SD-CF-2** gegen SIRT2, SIRT2 + 500 μM NAD⁺, SIRT2 + 5 μM TNFa-Myr und SIRT2 + 2000 μM TNFa-Ac **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt eine anfängliche Fluoreszenzänderung, daher wurde Die K_D Kurve über diese Änderung bestimmt (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

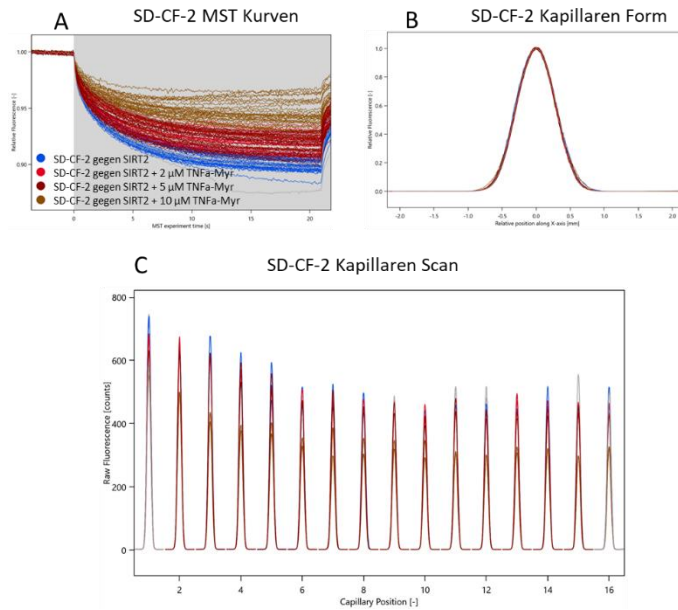


Abbildung S 95: MST-Analysebericht für die Verbindung **SD-CF-2** gegen SIRT2, SIRT2 + 2 μM TNFa-Myr⁺, SIRT2 + 5 μM TNFa-Myr und SIRT2 10 μM TNFa-Myr **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt eine anfängliche Fluoreszenzänderung, daher wurde Die K_D Kurve über diese Änderung bestimmt (Nano-BLUE-Anregungsleistung 40 %, MST-Leistung 40 %)

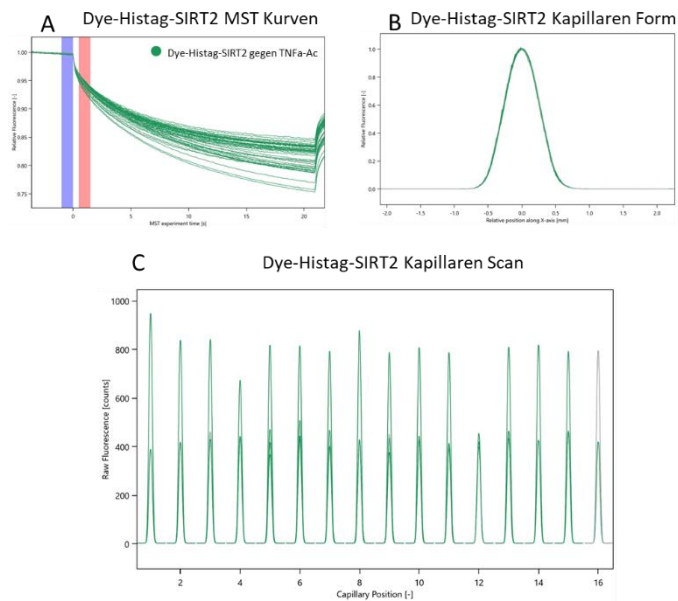


Abbildung S 96: MST-Analysebericht für Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit gegen TNFa-Ac, **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung, (Nano-RED-Anregungsleistung 80 %, MST-Leistung 40 %)

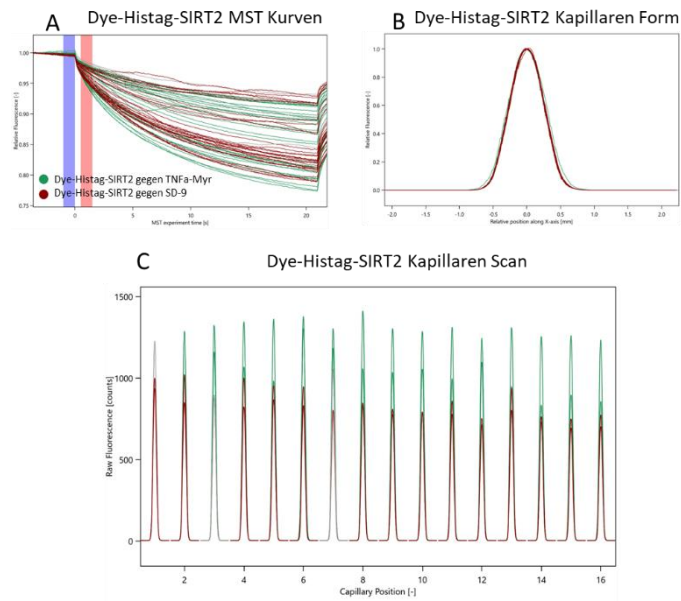


Abbildung S 97: MST-Analysebericht für Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit gegen TNFa-myrr und **SD-9**, **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung, (Nano-RED-Anregungsleistung 80 %, MST-Leistung 40 %)

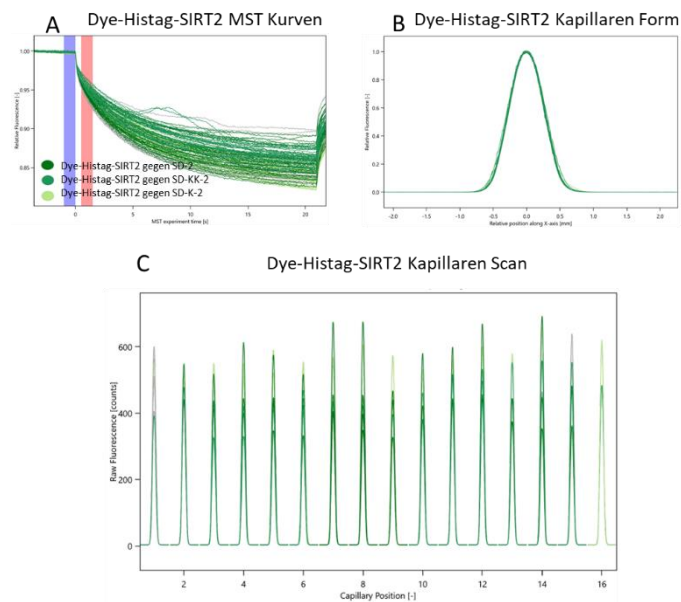


Abbildung S 98: MST-Analysebericht für Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit gegen **SD-2**, **SD-KK-2** und **SD-K-2** **[A]** MST-Kurven zeigen keine Aggregationen **[B]** Die Kapillaren form zeigt keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen **[C]** Der Kapillaren scan zeigt keine anfängliche Fluoreszenzänderung, (Nano-RED-Anregungsleistung 80 %, MST-Leistung 40 %)

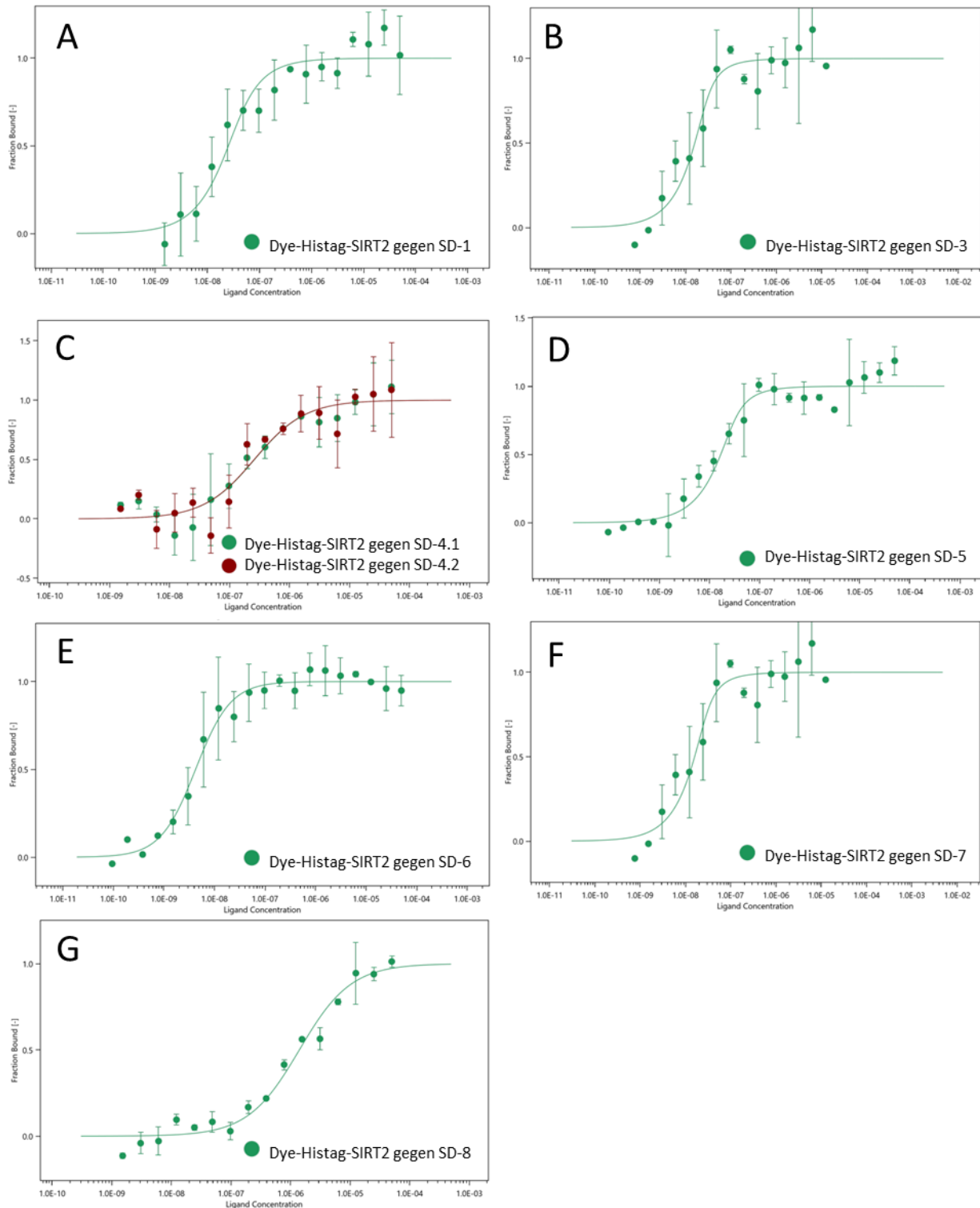


Abbildung S 99: Bindungsversuch mit MST von Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit : Dosis-Wirkungs-Analyse für [A] SD-1 [B] SD-3 [C] SD-4.1 und SD-4.2 [D] SD-5 [E] SD-6 [F] SD-7 [G] SD-8 Nano-RED-Anregungsleistung 80 % und MST-Leistung 40 %

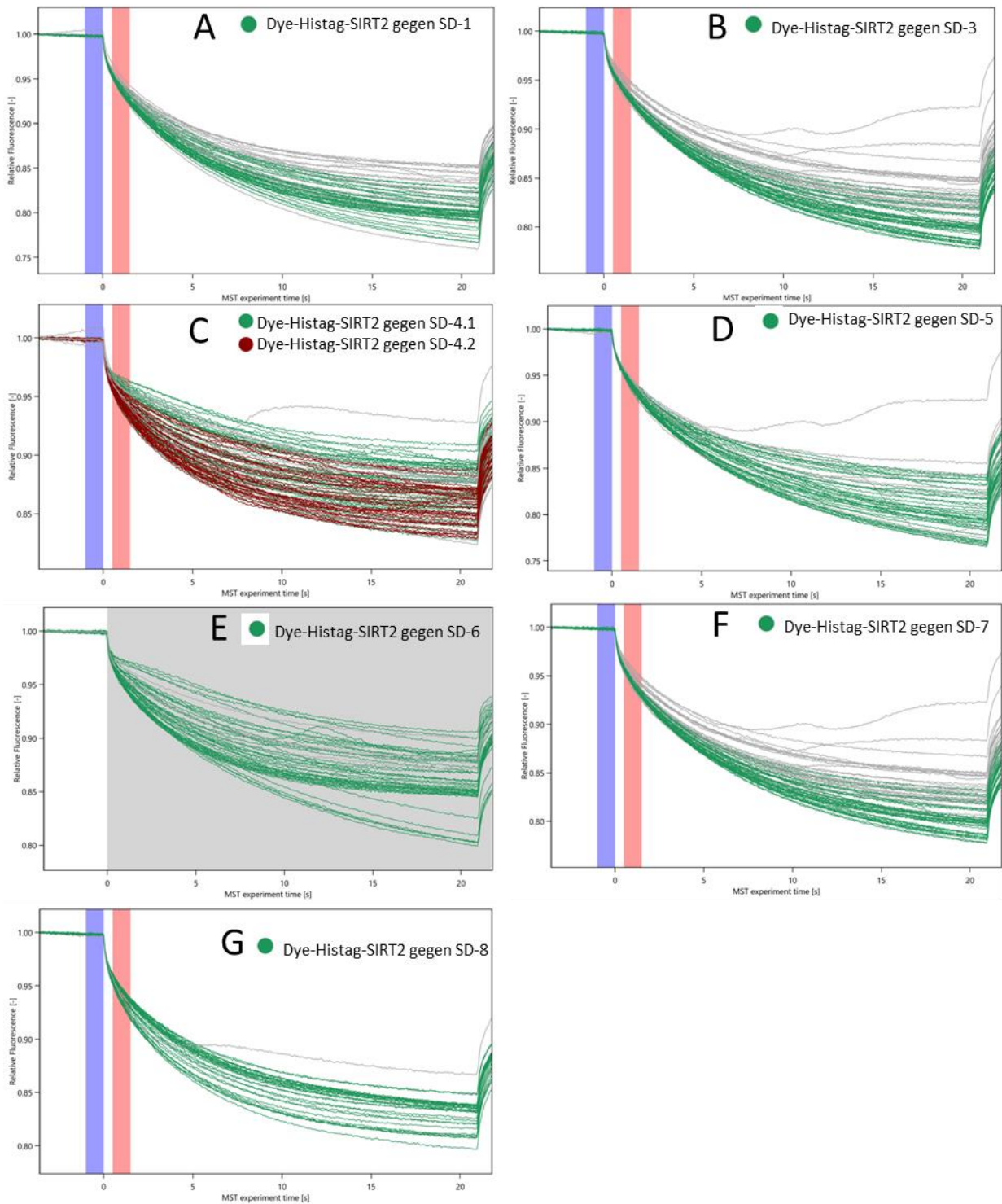


Abbildung S 100: MST-Analysebericht für Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit. MST-Kurven gegen [A] SD-1 [B] SD-3 [C] SD-4.1 und SD-4.2 [D] SD-5 [E] SD-6 [F] SD-7 [G] SD-8 zeigen keine Aggregationen. Nano-RED-Anregungsleistung 80 % und MST-Leistung 40 %

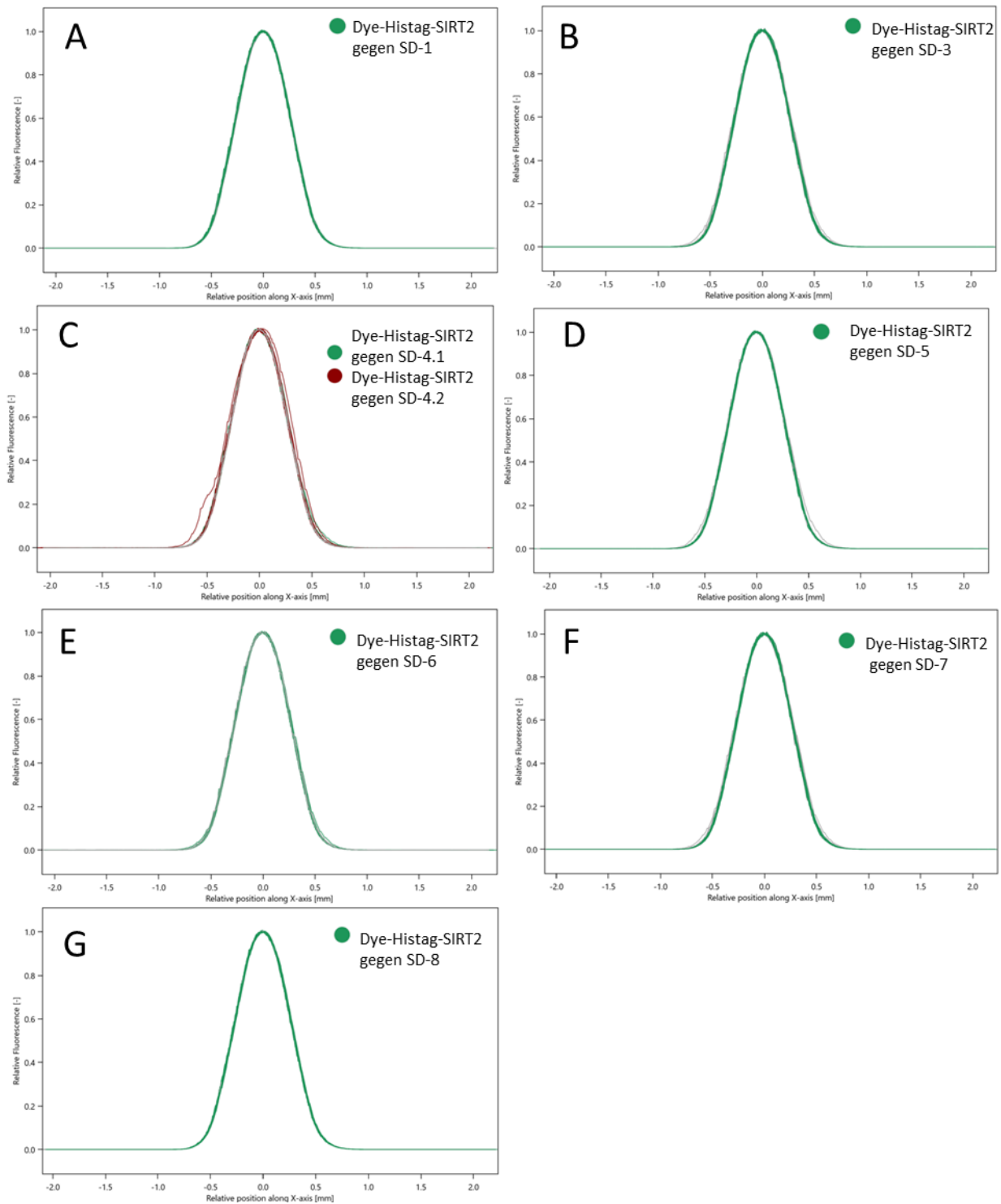


Abbildung S 101: MST-Analysebericht für Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit. Die Kapillaren form gegen [A] SD-1 [B] SD-3 [C] SD-4.1 und SD-4.2 [D] SD-5 [E] SD-6 [F] SD-7 [G] SD-8 zeigen keine Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen. Nano-RED-Anregungsleistung 80 % und MST-Leistung 40 %

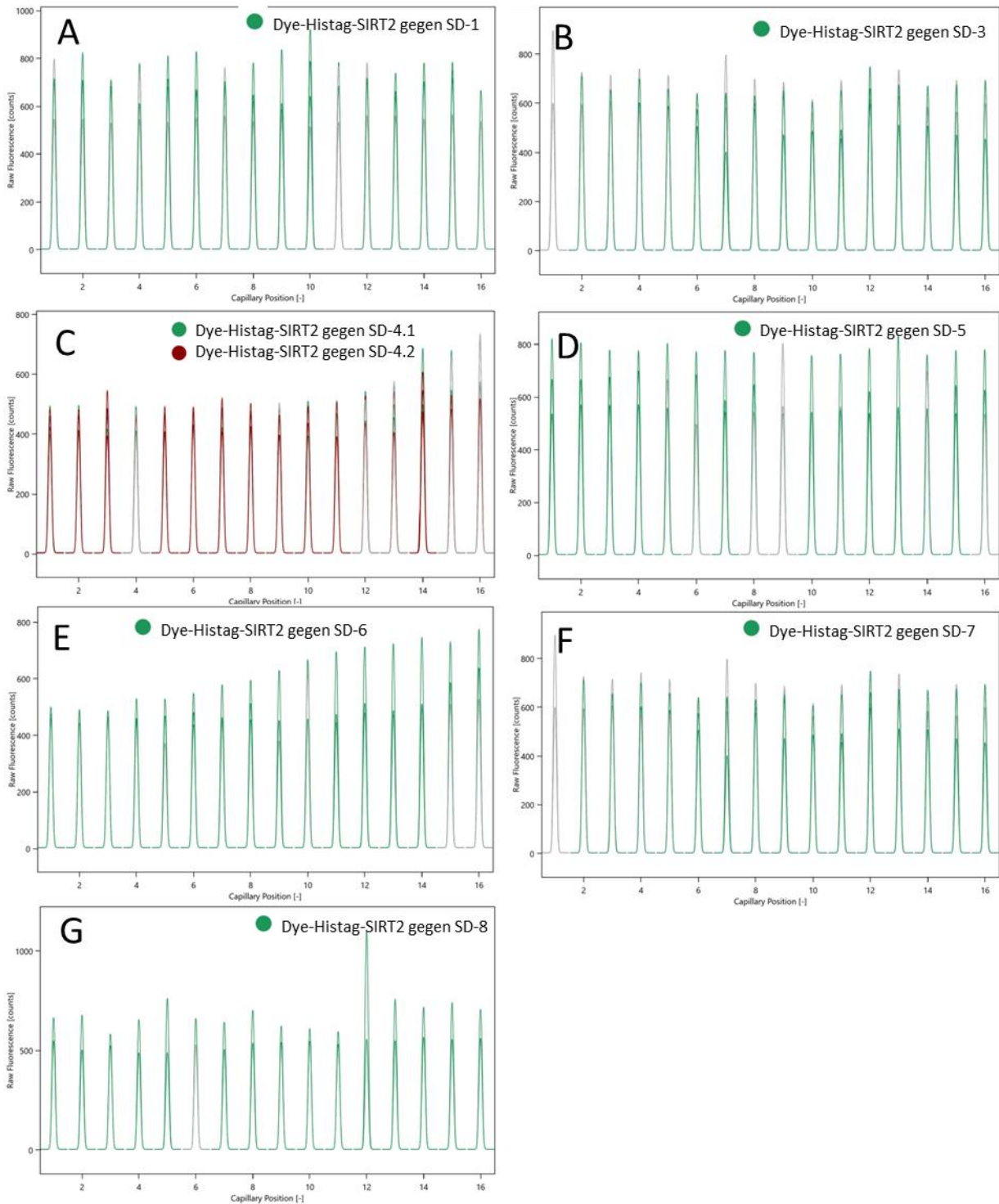


Abbildung S 102: MST-Analysebericht für Histag-SIRT2 gelabelt mit dem Dye aus dem Nanotemper RED-TRSI-NTA 2nd Generation Kit. Der Kapillaren scan gegen [A] SD-1 [B] SD-3 [C] SD-4.1 und SD-4.2 [D] SD-5 [E] SD-6 [F] SD-7 [G] SD-8 zeigen keine anfängliche Fluoreszenzänderung. Nano-RED-Anregungsleistung 80 % und MST-Leistung 40 %

SPR Messungen

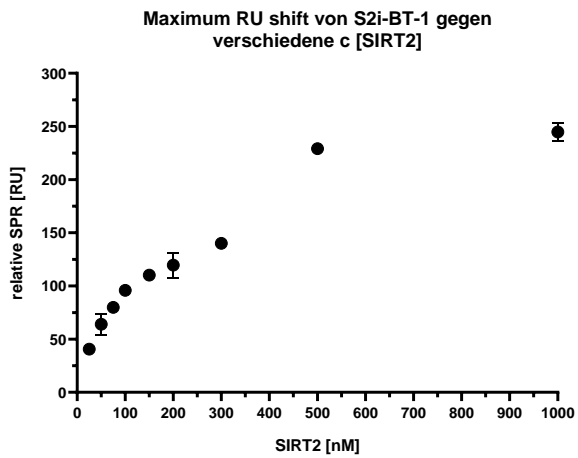


Abbildung S 103: Maximale RU-Verschiebung am Ende der Assoziationsphase (100 s) aufgetragen gegen verschiedene SIRT2-Konzentrationen ($n = 3$) bis zu $1 \mu\text{M}$. Die Bindung war bis zu 100 nM linear, was den Bewertungsbereich für die Geschwindigkeitskonstanten darstellt.

Tabelle S 4: Geschwindigkeitskonstanten von S2i-BT-1 zu SIRT2 mit und ohne NAD^+

| Geschwindigkeitskonstante | SIRT2 | SIRT2 mit $500 \mu\text{M NAD}^+$ |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| $k_{\text{on}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$ | $(3.27 \pm 0.14) \times 10^5$ | $(4.62 \pm 0.05) \times 10^5$ |
| $k_{\text{off}} [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$ | $(2.76 \pm 0.09) \times 10^{-3}$ | $(2.81 \pm 0.03) \times 10^{-3}$ |
| $K_{\text{D}} [\text{nM}]$ | $22.6 \pm 6.3 \text{ nM}$ | $5.77 \pm 0.16 \text{ nM}$ |

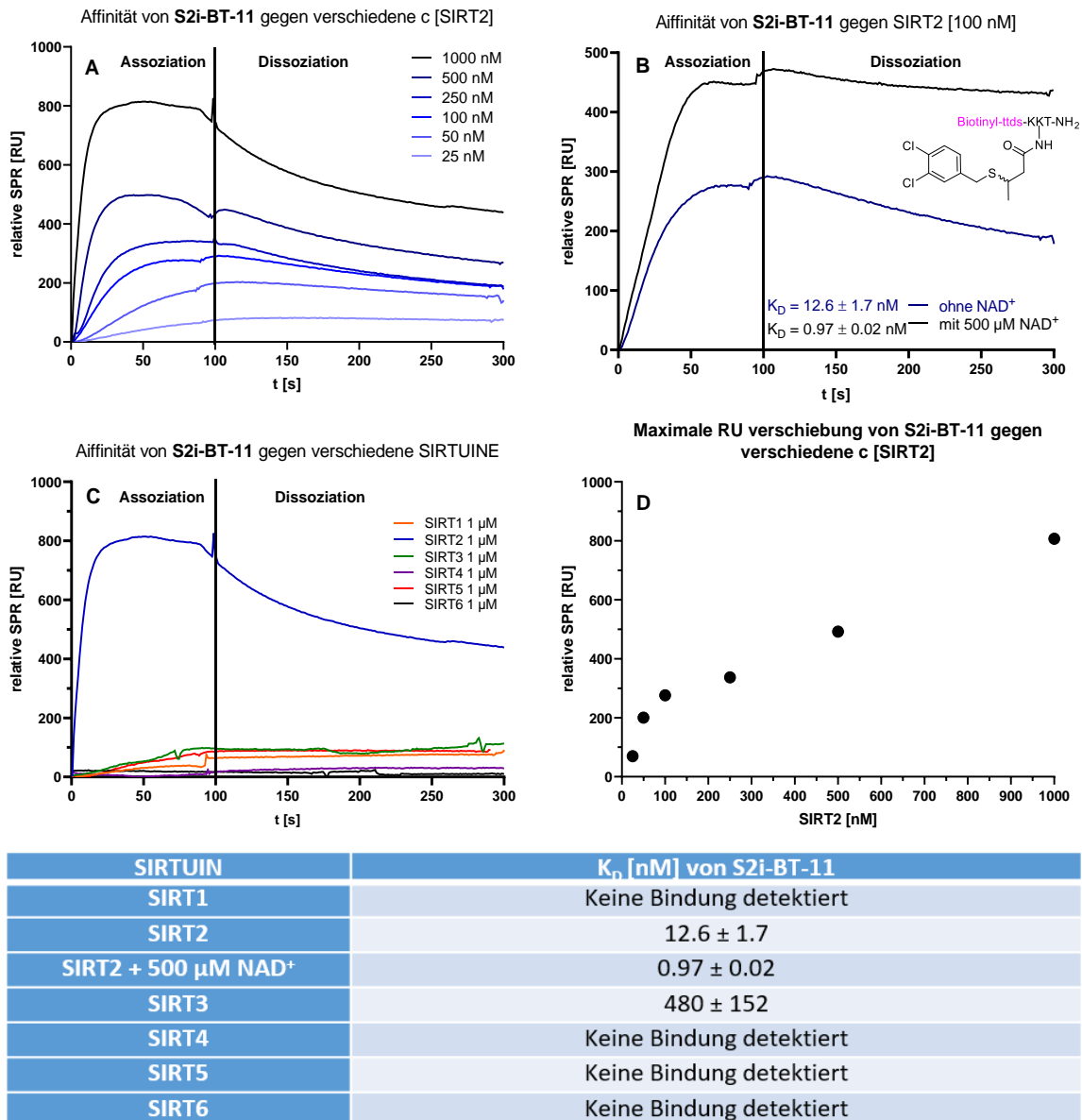
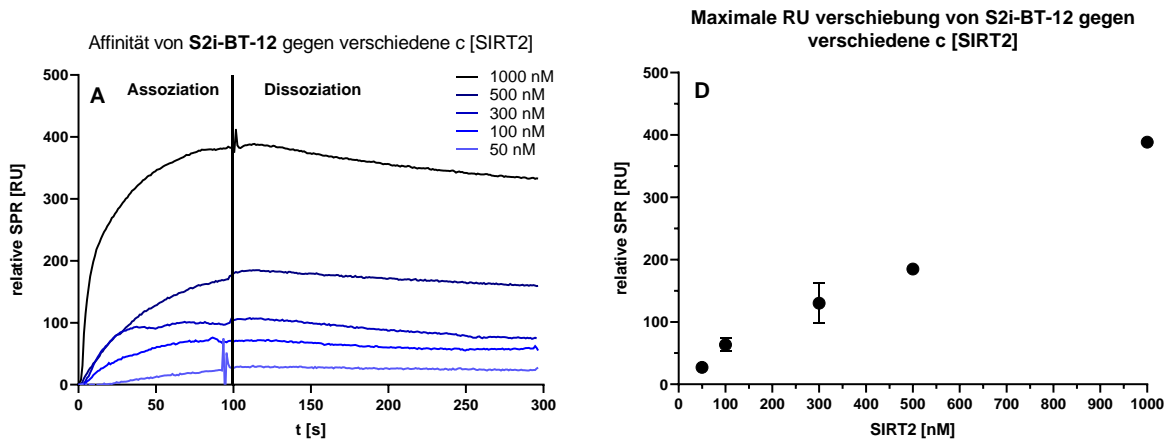


Abbildung S 104: SPR-Messungen von **S2i-BT-11** [A] Biophysikalische Charakterisierung der Verbindung **S2i-BT-11** durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), das Sensorgramm zeigt die Bindung von SIRT2 an den immobilisierten Inhibitor mit folgenden Geschwindigkeitskonstanten: $k_{on} = (1.97 \pm 0.32) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{off} = (2.52 \pm 0.59) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ergeben einen K_D -Wert von etwa $12.6 \pm 1.7 \text{ nM}$ [B] Biophysikalische Charakterisierung der Verbindung **S2i-BT-11** durch SPR, die die Bindung von SIRT2 an den immobilisierten Inhibitor mit und ohne $500 \mu\text{M NAD}^+$ in PBS-Puffer zeigt, die Geschwindigkeitskonstanten haben sich mit NAD^+ verbessert [C] Biophysikalische Charakterisierung der Verbindung **S2i-BT-11** durch SPR, die die Bindung verschiedener SIRTUIN-Isoformen bei $1 \mu\text{M}$ zeigt. Die Interaktion zwischen **S2i-BT-11** und SIRT2 scheint sehr spezifisch zu sein. [D] Maximale RU-Verschiebung, die am Ende der Assoziationsphase (100 s) festgestellt wurde, aufgetragen gegen verschiedene SIRT2-Konzentrationen ($n = 3$) bis zu $1 \mu\text{M}$. Die Bindung war bis zu 100 nM linear, was den Bewertungsbereich für die Geschwindigkeitskonstanten darstellt

Tabelle S 5: Geschwindigkeitskonstanten von **S2i-BT-11** zu SIRT2 mit und ohne NAD^+

| Geschwindigkeitskonstante | SIRT2 | SIRT2 mit $500 \mu\text{M NAD}^+$ |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| $k_{on} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ | $(1.97 \pm 0.32) \times 10^5$ | $(3.29 \pm 0.49) \times 10^5$ |
| $k_{off} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ | $(2.52 \pm 0.59) \times 10^{-3}$ | $(0.86 \pm 0.05) \times 10^{-3}$ |
| $K_D [\text{nM}]$ | $12.6 \pm 1.7 \text{ nM}$ | $0.97 \pm 0.02 \text{ nM}$ |



| SIRTUIN | K_D [nM] von S2i-BT-12 |
|--------------------------------------|--------------------------|
| SIRT1 | Keine Bindung detektiert |
| SIRT2 | 0.47 ± 0.03 |
| SIRT2 + 500 μ M NAD ⁺ | 1.33 ± 0.24 |
| SIRT3 | 3112 ± 1370 |
| SIRT4 | 48.2 ± 3.9 |
| SIRT5 | 99.6 ± 13.4 |
| SIRT6 | 2273 ± 1221 |

Abbildung S 105: SPR-Messungen von S2i-BT-12 [A] Biophysikalische Charakterisierung der Verbindung S2i-BT-12 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), das Sensorgramm zeigt die Bindung von SIRT2 an den immobilisierten Inhibitor mit folgenden Geschwindigkeitskonstanten: $k_{on} = (2.29 \pm 0.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{off} = (1.13 \pm 0.04) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ergeben einen K_D -Wert von etwa $0.47 \pm 0.03 \text{ nM}$. [B] Maximale RU-Verschiebung, die am Ende der Assoziationsphase (100 s) festgestellt wurde, aufgetragen gegen verschiedene SIRT2-Konzentrationen (n = 3) bis zu 1 μ M. Die Bindung war bis zu 1000 nM linear, was den Bewertungsbereich für die Geschwindigkeitskonstanten darstellt

Tabelle S 6: Geschwindigkeitskonstanten von S2i-BT-12 zu SIRT2 mit und ohne NAD⁺

| Geschwindigkeitskonstante | SIRT2 | SIRT2 mit 500 μ M NAD ⁺ |
|--|----------------------------------|--|
| $k_{on} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ | $(2.29 \pm 0.70) \times 10^5$ | $(2.40 \pm 0.76) \times 10^5$ |
| $k_{off} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ | $(1.13 \pm 0.04) \times 10^{-4}$ | $(3.19 \pm 0.03) \times 10^{-4}$ |
| K_D [nM] | $0.47 \pm 0.03 \text{ nM}$ | $1.33 \pm 0.24 \text{ nM}$ |

Biologische Messungen

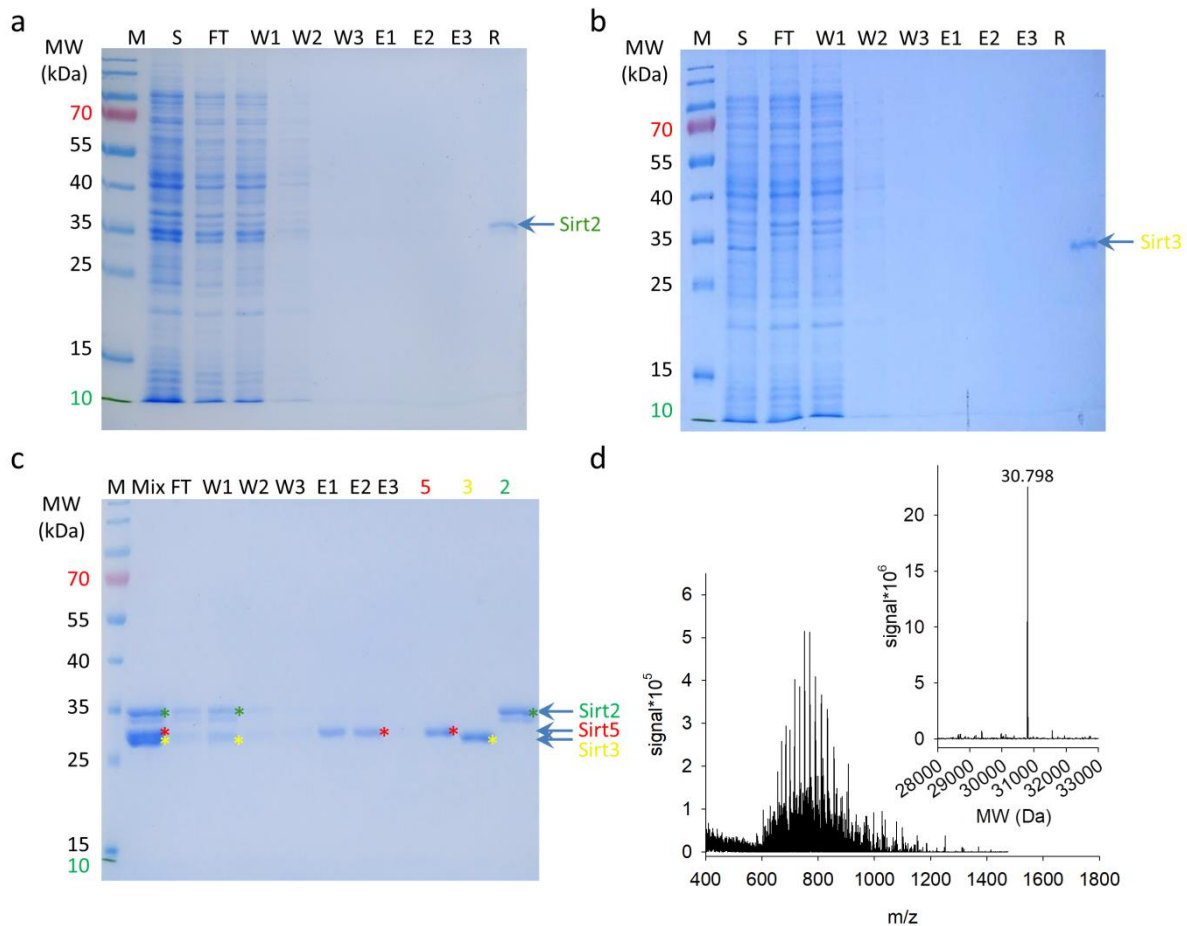


Abbildung S 106: Immobilisiertes **S5i-BT-33(S)** bindet selektiv Sirt5 aus *E.coli*-Lysat ein. **[A]** SDS-Page-Analyse (Coomassie-Färbung) von **S5i-BT-33(S)**, das an Streptavidin-beschichtete Agarose gebunden ist und mit *E.coli* BL21 (DE3) Lysat, das Sirt2 exprimiert, säulenchromatographisch interagiert. Im Gegensatz zu Sirt5-exprimierenden *E.coli*-Zellen wurde kein Protein aus der Matrix eluiert, was darauf hindeutet, dass SIRT2 nicht an den Inhibitor gebunden hat. **[B]** Capture-Studien mit SIRT3-exprimierenden *E.coli*-Zellen zeigen ähnliche Ergebnisse wie SIRT2: SIRT3 wurde nicht aus der Inhibitor-Matrix eluiert, obwohl SIRT3 etwas stärker mit dem Inhibitor zu interagieren scheint als SIRT2, was zu einer schwächeren SIRT2-Bande im Durchfluss im Vergleich zum Überstand führt. **[C]** Zuletzt wurde eine äquimolare Mischung von SIRT2, SIRT3 und SIRT5 säulenchromatographisch auf die Inhibitor-Matrix aufgetragen und mittels SDS-Page analysiert. SIRT2 und SIRT3 wurden ausschließlich in der Durchfluss- und Waschfraktion nachgewiesen. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden mittels Massenspektrometrie analysiert **[D]**. Das eluierte Protein wurde eindeutig als Sirt5 identifiziert ($M_{\text{calc.}} = 30.796 \text{ Da}$, $M_{\text{found}} = 30.798 \text{ Da}$). S...Überstand nach Zellaufschluss, FT...Durchfluss, W...Waschfraktionen, E...Elutionsfraktionen.

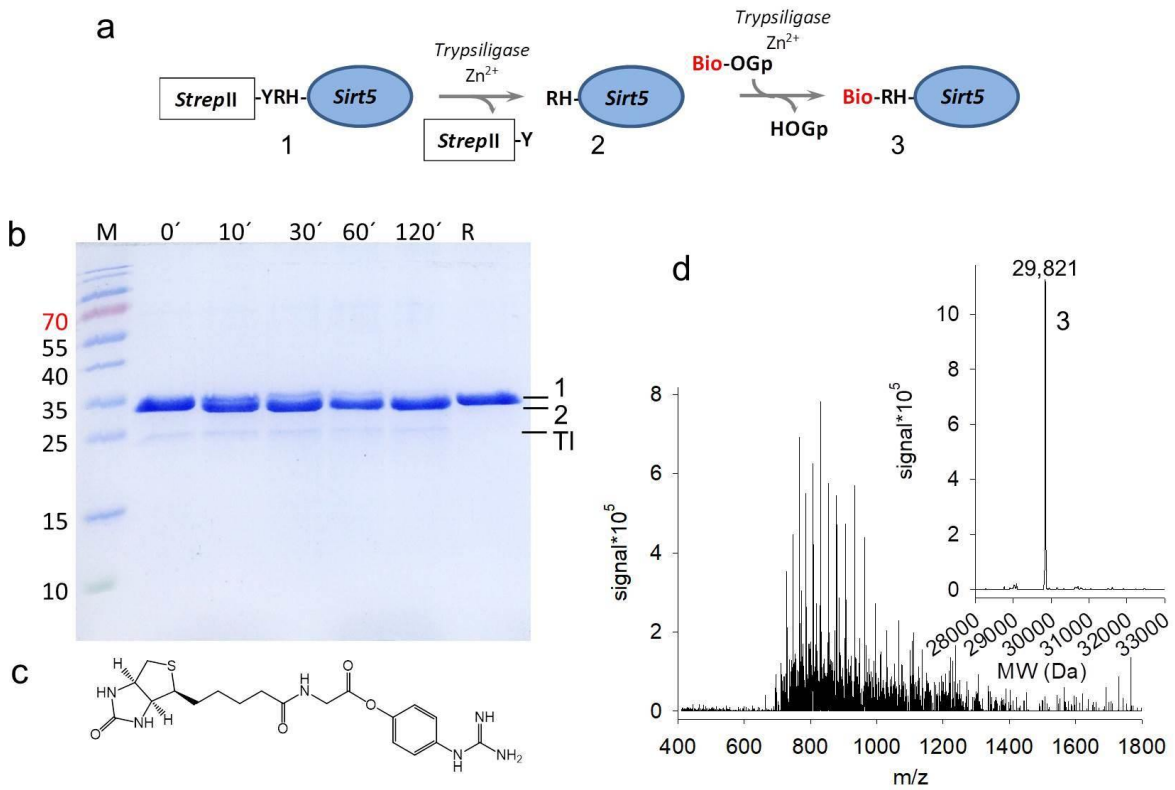


Abbildung S 107: Trypsiligase-catalysierte biotinylation von SIRT5.

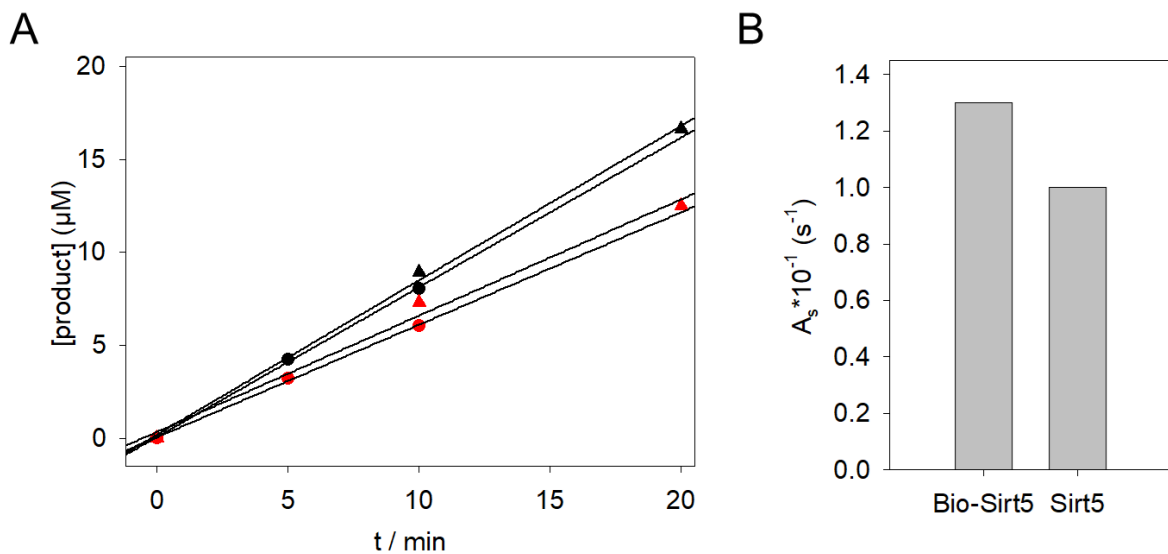


Abbildung S 108: Biotinyliertes SIRT5 zeigt eine ähnliche Aktivität wie das unmodifizierte SIRT5. **[A]** Produktbildung in einem Deacetylierungsassay für Bio-SIRT5 (schwarz) und SIRT5 (rot) bei [Substrat] = 10 µM (Kreis) bzw. 50 µM (Dreieck). **[B]** Spezifische Aktivität von Bio-SIRT5 (0,13 s⁻¹) und SIRT5 (0,1 s⁻¹). Bedingungen: 100 nM SIRT5, [CPS1] = 10 µM, 50 µM, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ pH 7,8, T=37°C, jeder Punkt wurde als Doppelbestimmung gemessen (Abweichung <1%).

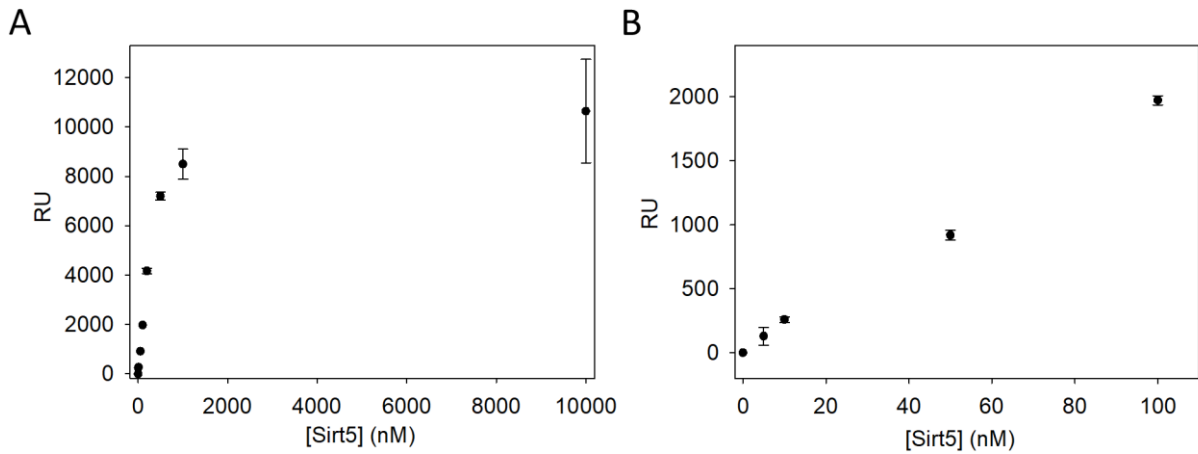


Abbildung S 109: Maximale RU-Verschiebung, die am Ende der Assoziationsphase gemessen wurde, aufgetragen gegen die SIRT5-Konzentration (n = 3). **[A]** RU gegen SIRT5-Konzentration bis zu 10 μ M. **[B]** Linearer Bereich (0-100 nM SIRT5).

Tabelle S 7: Thermostabilität von SIRT2 in An- und Abwesenheit verschiedener Inhibitoren und NAD⁺

| Komponenten | Temperatur (°C) |
|------------------------------------|-----------------|
| SIRT2 | 50.32 ± 0.60 |
| SIRT2 + NAD ⁺ | 50.32 ± 0.60 |
| SIRT2 + SirREAL2 | 54.15 ± 0.15 |
| SIRT2 + SirREAL2+ NAD ⁺ | 57.00 ± 0.01 |
| SIRT2 + S2i-1 | 55.63 ± 0.53 |
| SIRT2 + S2i-1 + NAD ⁺ | 57.23 ± 0.51 |
| SIRT2 + S2i-12 | 54.20 ± 0.70 |
| SIRT2 + S2i-12 + NAD ⁺ | 55.23 ± 0.65 |
| SIRT2 + S5i 9.1 | 50.40 ± 0.57 |
| SIRT2 + S5i 9.1 + NAD ⁺ | 50.40 ± 0.57 |

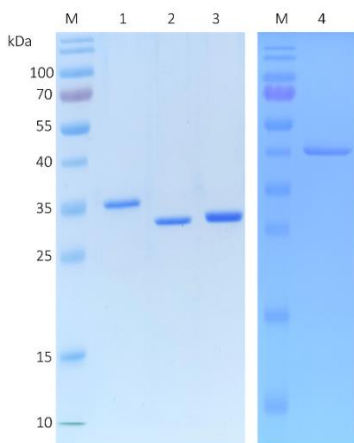


Abbildung S 110: SDS-page Analyse (Coomassie Färbung) der genutzten SIRTUINE. M...MW Marker (PageRuler™ prestained), 1...StreptII-Sirtuin 2, 2...StreptII-Sirtuin 3, 3...StreptII-Sirtuin 5, 4...StreptII-Sirtuin 6.

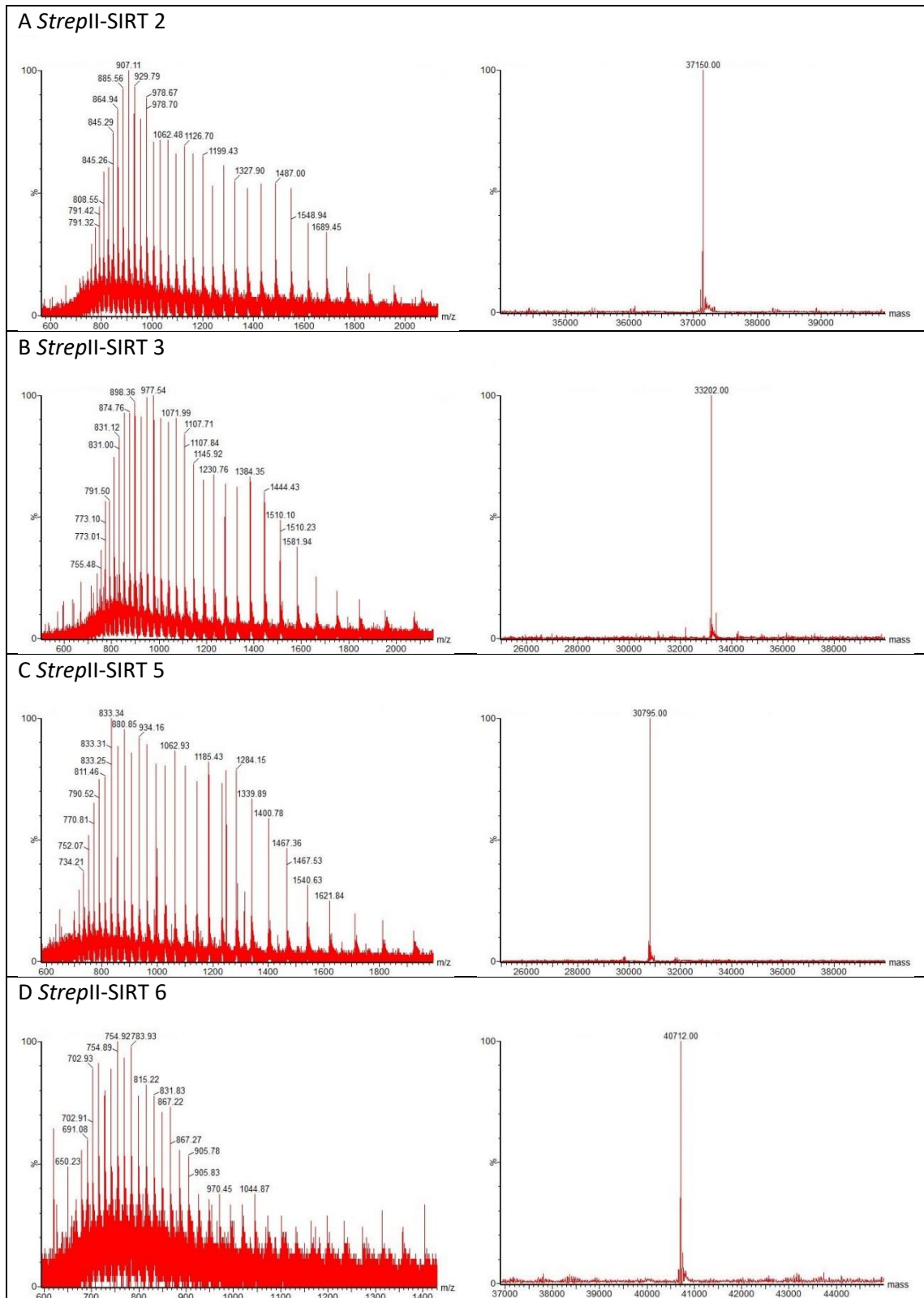


Abbildung S 111: Massenspektrometrie Analysen [links] und nachfolgende algorithmische Entfaltung [rechts] der fertigen SIRTUINE mittels *electron spray ionization* durch ein Waters Q-ToF Premier. **[A]** StreptII-SIRT2: $M_{\text{calc.}} = 37,151.7 \text{ Da}$, $M_{\text{found}} = 37,150.0 \text{ Da}$; **[B]** StreptII-SIRT3: $M_{\text{calc.}} = 33,203.1 \text{ Da}$, $M_{\text{found}} = 33,202.0 \text{ Da}$; **[C]** StreptII-SIRT5: $M_{\text{calc.}} = 30,796.0 \text{ Da}$, $M_{\text{found}} = 30,795.0 \text{ Da}$; **[D]** StreptII-SIRT6: $M_{\text{calc.}} = 40,712.5 \text{ Da}$, $M_{\text{found}} = 40,712.0 \text{ Da}$.

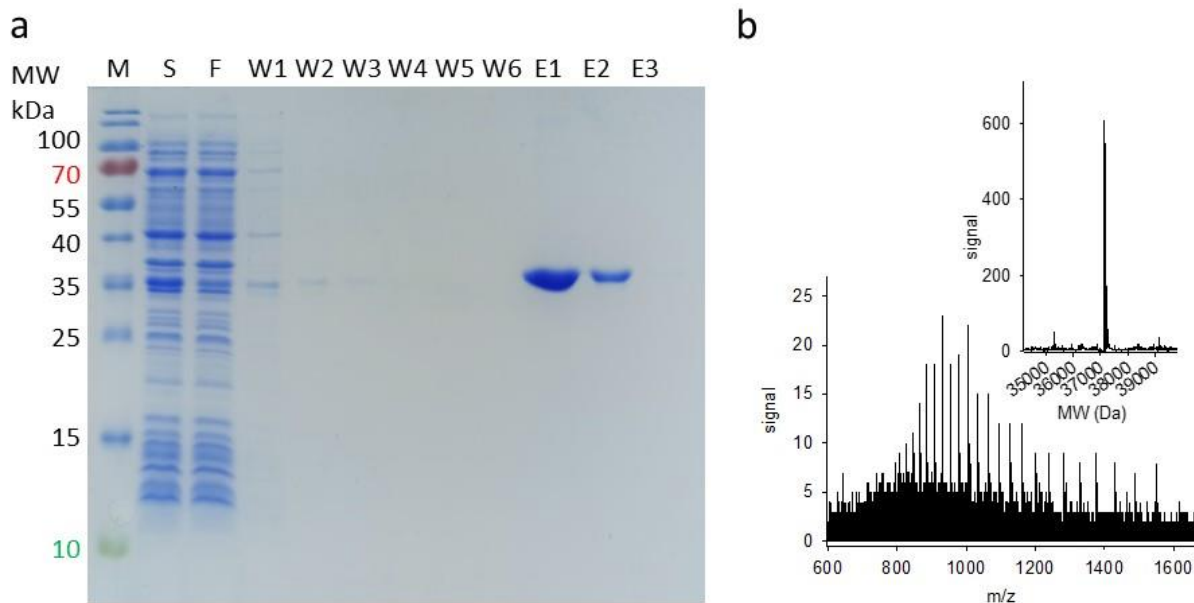


Abbildung S 112: Immobilisiertes **S2i-BT-1** fängt humanes SIRT2 aus *E. coli*-Lysat ab. **[A]** SDS-PAGE-Analyse (Coomassie-Färbung) von *E. coli* BL21 (DE3)-Lysat, das humanes SIRT2 exprimiert, das mit dem biotinylierten Inhibitor **S2i-BT-1** interagiert, der an Avidin-beschichtete Agarose gebunden ist. Ausschließlich SIRT2 wurde durch Zugabe von 200 mM NaOH von der Matrix eluiert. Abkürzungen: M, Molekulargewichtsmarker PageRuler™ vorgefärbt; S, Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation; F, Durchfluss; W1-W6, Waschfraktionen; E1-E3, Elutionsfraktionen. **[B]** ESI-MS-Analyse der Elutionsfraktion E1; M_{calc} = 37.151 Da, M_{found} = 37.154 Da.

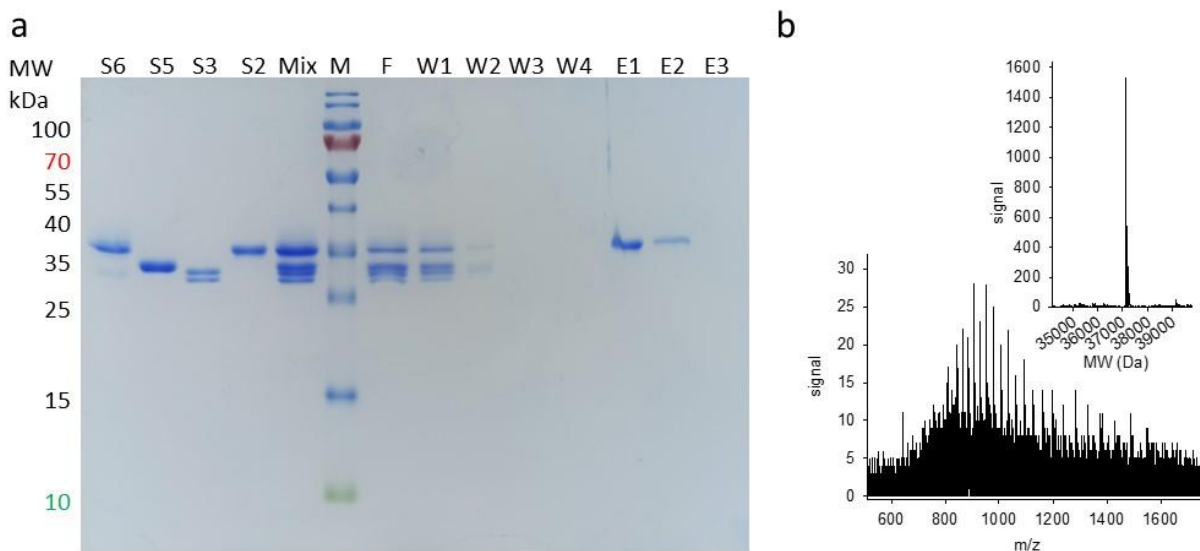


Abbildung S 113: Immobilisiertes **S2i-BT-1** fängt selektiv SIRT2 aus einer äquimolaren Mischung von SIRT2, SIRT3, SIRT5 und SIRT6 ab. **[A]** Die Proteinmischung wurde säulenchromatographisch auf den immobilisierten Inhibitor aufgetragen und mittels SDS-Page analysiert. SIRT5 und SIRT3 wurden ausschließlich im Durchfluss nachgewiesen. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden mittels Massenspektrometrie analysiert **[B]**. Das eluierte Protein wurde eindeutig als SIRT2 identifiziert (M_{calc} = 37.151 Da, M_{found} = 37.154 Da). Abkürzungen: M, Molekulargewichtsmarker PageRuler™ vorgefärbt; S6, S5, S3, S2...Sirtuine, F...flow through, W...wash fractions, E...Elution fractions.

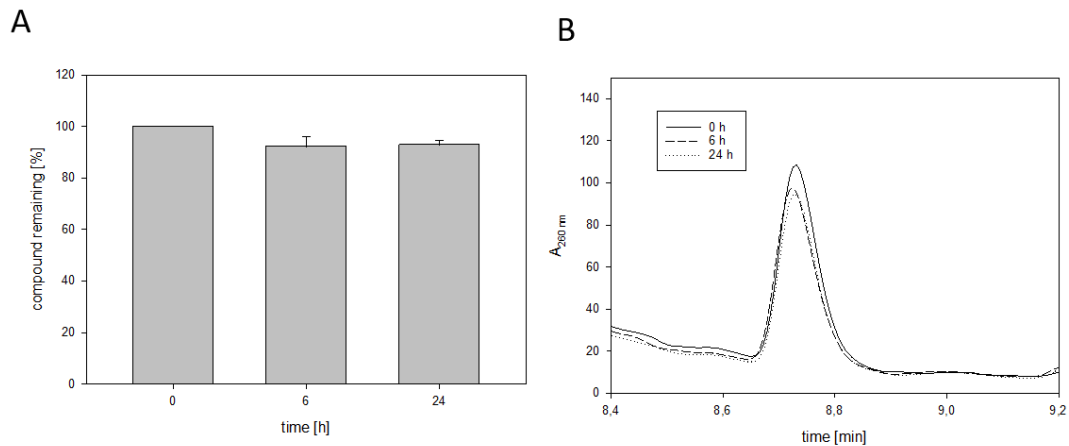


Abbildung S 114: Stabilitätsanalyse in Humanserum. **[A]** Stabilitätsanalyse von Verbindung **S2i-12** in männlichem Humanserum nach 0, 6 und 24 Stunden bei 37°C. **[B]** UV (A_{260nm}) Chromatogramme von Verbindung **S2i-12** nach 0, 6 und 24 Stunden bei 37°C. Die Daten sind als Mittelwerte bezogen auf die Peakintensität bei 0 h angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar.

Kristalldaten

Tabelle S 8: Datenzusammenfassung und Verfeinerungsstatistiken

| | zSirt5/compound 2 | zSirt5/ compound 15 | zSirt5/compound 33.2 |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Space group | P6 ₅ 22 | P6 ₅ 22 | P6 ₅ 22 |
| Unit cell constants (Å) | 87.2, 87.2, 318.9 | 87.1, 87.1, 316.7 | 87.2, 87.2, 317.6 |
| Resolution ^(a) (Å) | 50.00 – 3.30 (3.39 – 3.30) | 50.00 – 2.98 (3.16 – 2.98) | 20.00 – 2.50 (2.56 – 2.50) |
| Unique reflections | 10989 (1671) | 15459 (2399) | 25573 (1857) |
| Multiplicity | 4.1 (4.3) | 15.5 (16.0) | 10.6 (11.1) |
| Completeness | 99.5% (99.3%) | 99.8% (99.1%) | 99.6% (99.9%) |
| <i>R</i> _{meas} | 39.3% (121.8%) | 35.8% (210.0%) | 35.1% (822.4%) |
| <i>CC1/2</i> | 93.8 (49.6) | 99.4 (51.3) | 99.5 (12.8) |
| <i>I/σI</i> | 5.0 (1.4) | 9.8 (1.3) | 7.2 (0.3) |
| Protein atoms | 4135 | 4103 | 4128 |
| Ligand atoms | 164 | 166 | 86 |
| Solvent atoms | 59 | 75 | 90 |
| Resolution (Å) | 48.73 – 3.30 (3.39 – 3.30) | 48.51 – 2.98 (3.06 – 2.98) | 19.85 – 2.50 (2.56 – 2.50) |
| <i>R</i> _{cryst} / <i>R</i> _{free} ^{(b)(c)} | 22.2 / 28.4 | 19.8 / 27.5 | 24.9 / 31.7 |
| Average B- factors | | | |
| protein | 62.3 | 69.0 | 74.3 |
| ligands | 73.8 | 72.4 | 97.6 |
| solvent | 35.3 | 47.8 | 75.7 |
| RMSD bond-lengths | 0.012 | 0.014 | 0.012 |
| RMSD angles | 1.7 | 1.9 | 1.963 |

(a) Values in parentheses refer to outermost shell.

$$(b) R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} . |F_{obs}| \text{ is the observed and } |F_{calc}| \text{ the calculated structure factor amplitude.}$$

(c) R_{free} was calculated from 5% of reflections omitted from refinement.

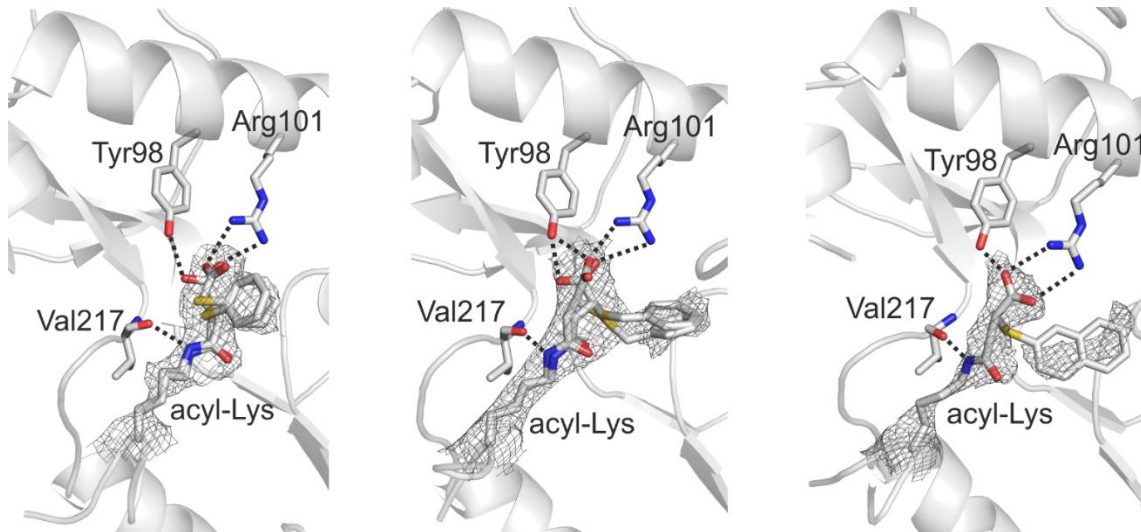


Abbildung S 115: [Links] Kristallstruktur eines zSirt5/S5i-2-Komplexes. Die Acyl-Lys- und interagierenden Reste sind als Stäbchen dargestellt, und die 2Fo-Fc-Elektronendichte für den Inhibitor ist bei 1σ eingezeichnet. [Mitte]: Kristallstruktur eines zSirt5/S5i-15-Komplexes. Die Acyl-Lys- und interagierenden Reste sind als Stäbchen dargestellt, und die 2Fo-Fc-Elektronendichte für den Inhibitor ist bei 1 eingezeichnet. [Rechts]: Kristallstruktur eines zSirt5/Si5-33.2-Komplexes. Die Acyl-Lys- und interagierenden Reste sind als Stäbchen dargestellt, und die 2Fo-Fc-Elektronendichte für den Inhibitor ist bei $0,9\sigma$ eingezeichnet.

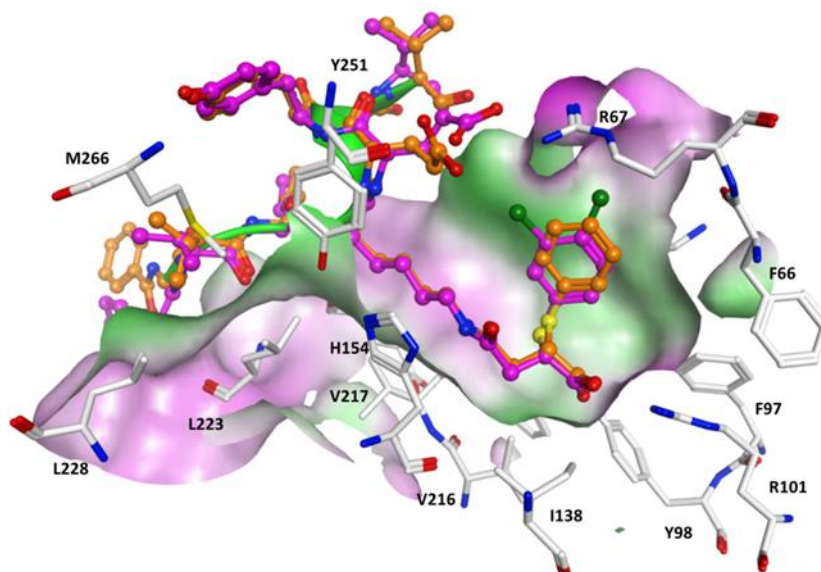


Abbildung S 116: Vergleich der bestplatzierten Docking-Pose von S5i-8.2 (magentafarben) und der Kristallstruktur von zSirt5/S5i-2.2 (orange). Die molekulare Oberfläche der zSirt5-Bindungstasche ist dargestellt und entsprechend der Hydrophobie eingefärbt (polare Bereiche sind magentafarben, hydrophobe Bereiche sind grün eingefärbt).

LC-MC-Läufe

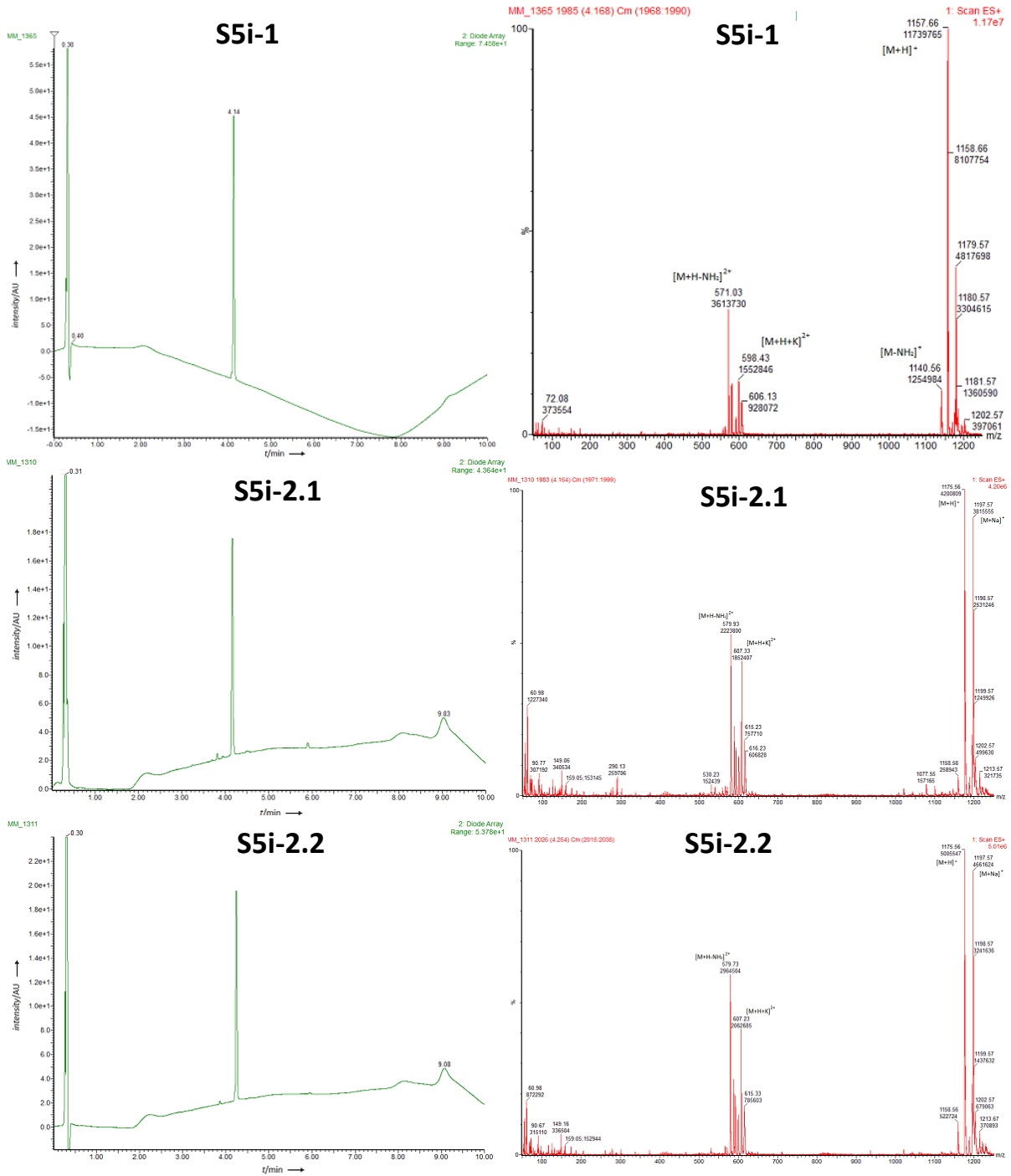


Abbildung S 117: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-1 bis S5i-2.2

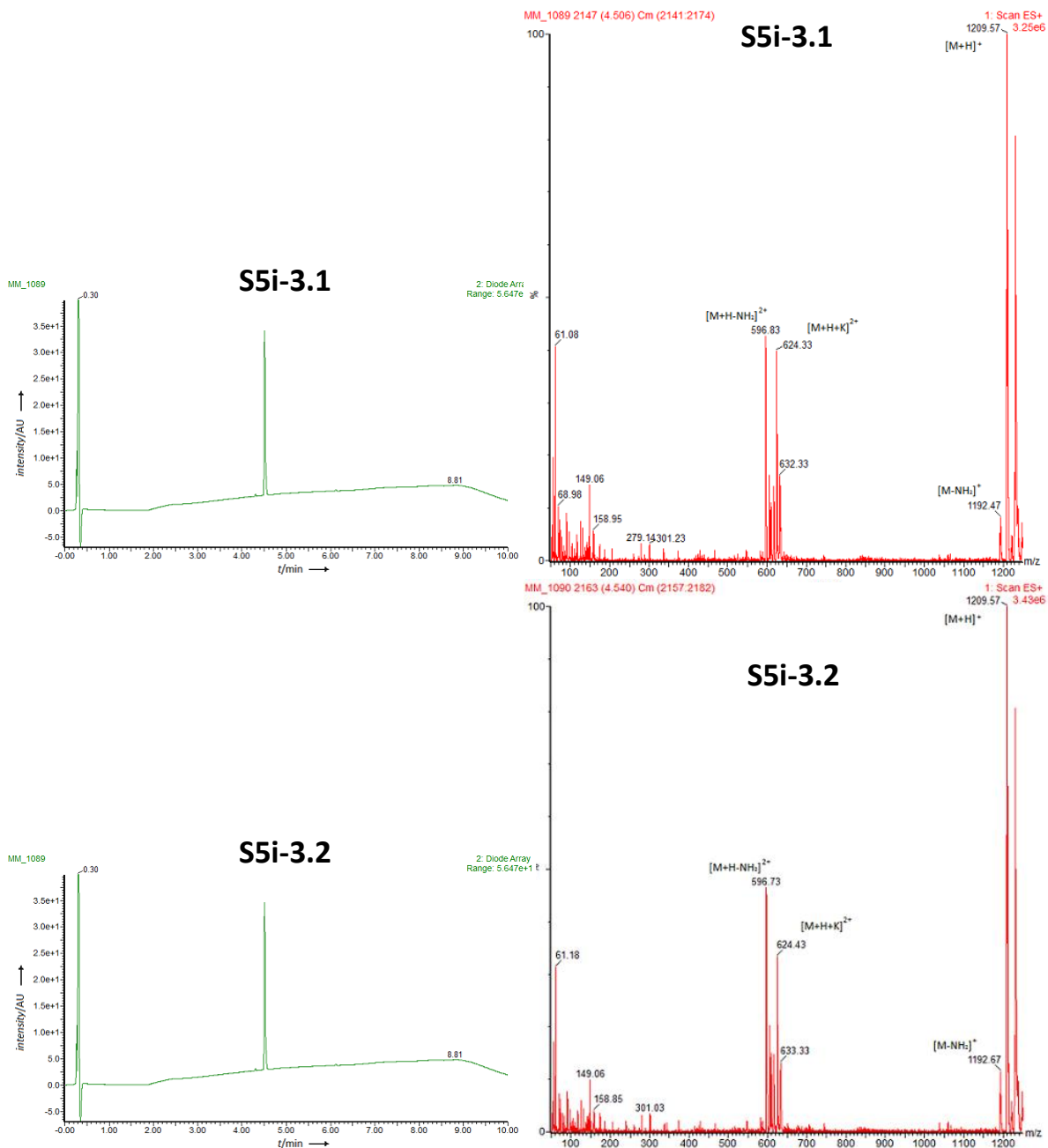


Abbildung S 118: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-3.1 und S5i-3.2

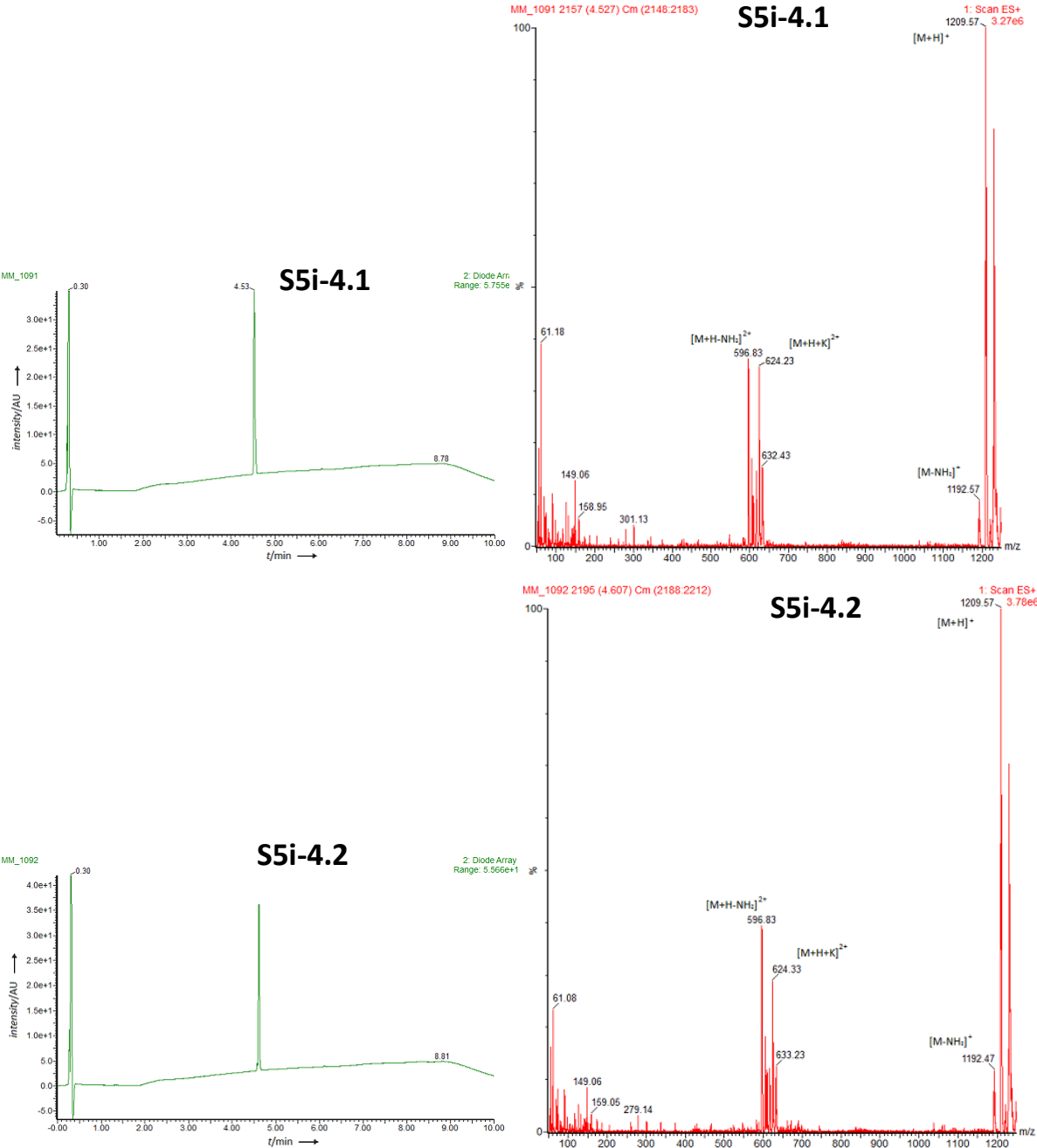


Abbildung S 119: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-4.1 und S5i-4.2

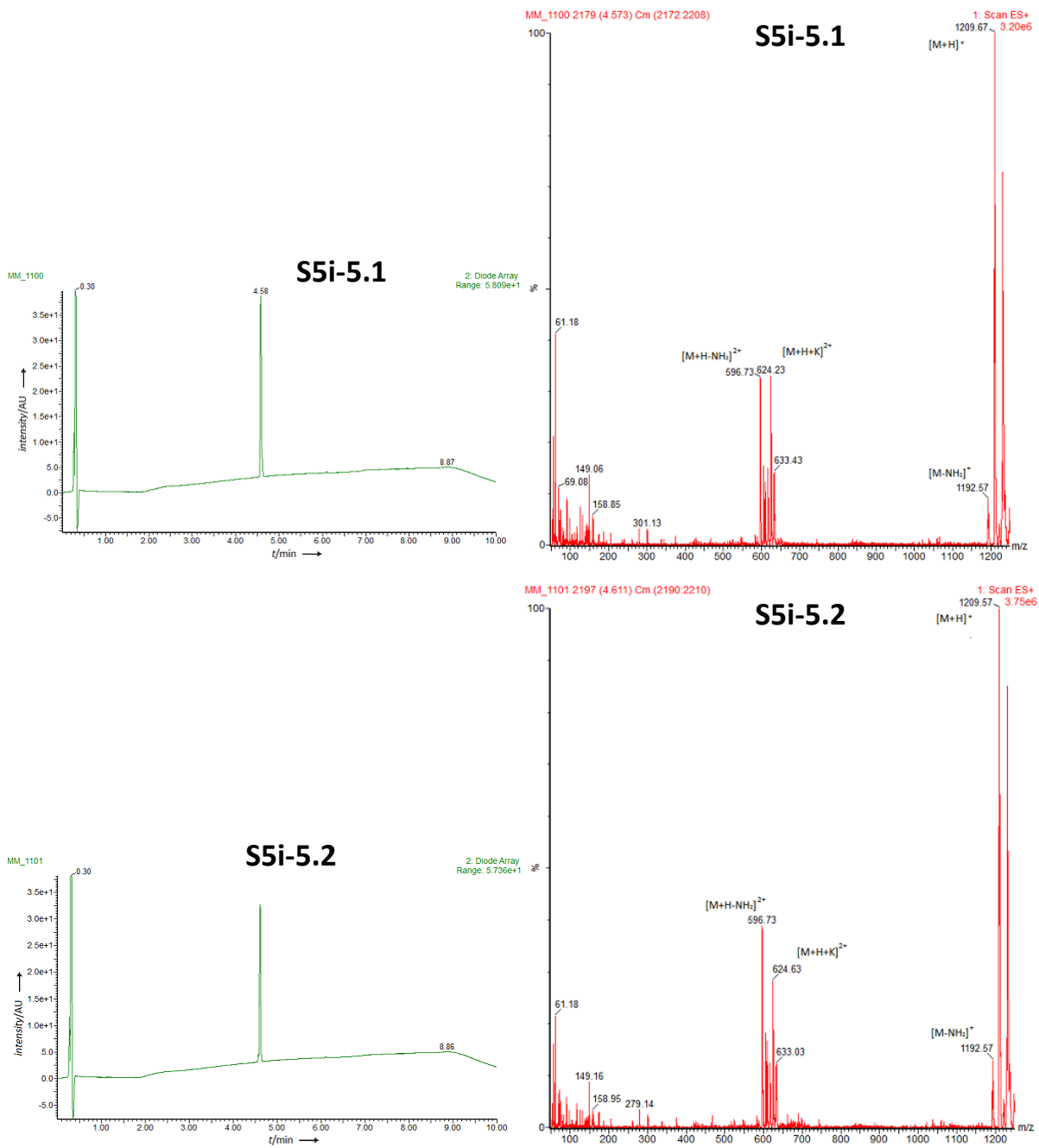


Abbildung S 120: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-5.1 und S5i-5.2

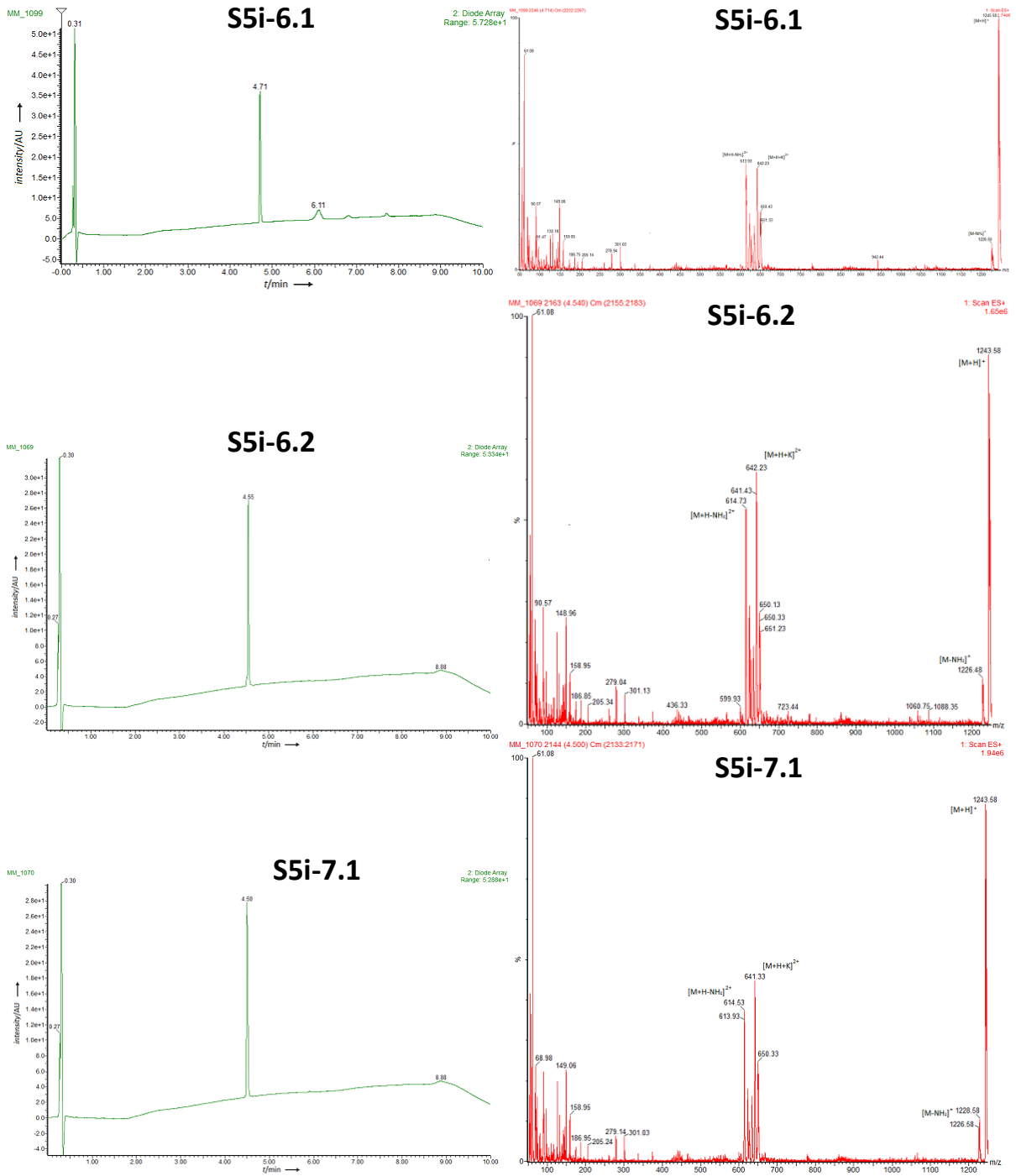


Abbildung S 121: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-6.1 und S5i-6.2 und S5i-7.1

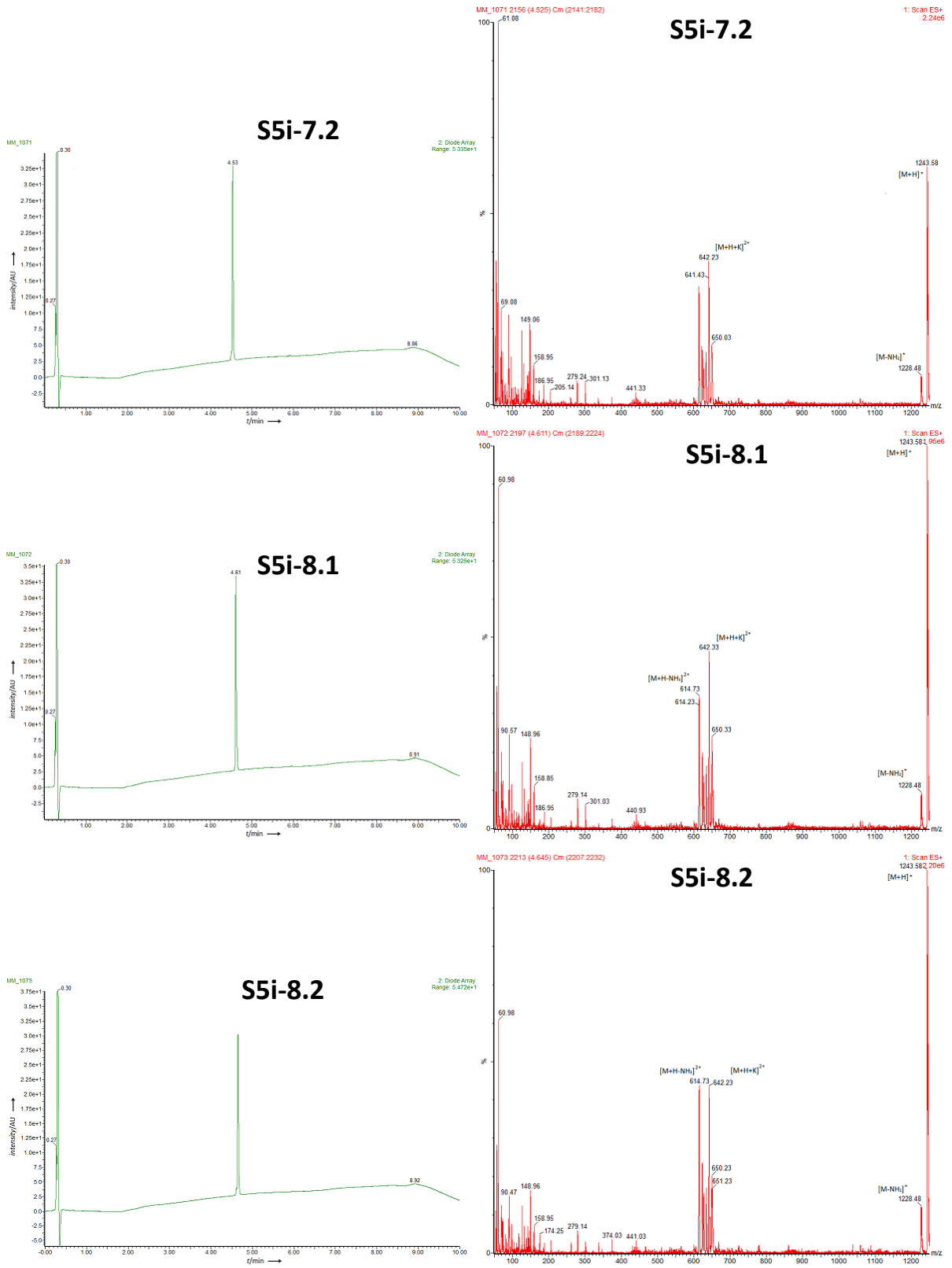


Abbildung S 122: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-7.2 und S5i-8.1 und S5i-8.2

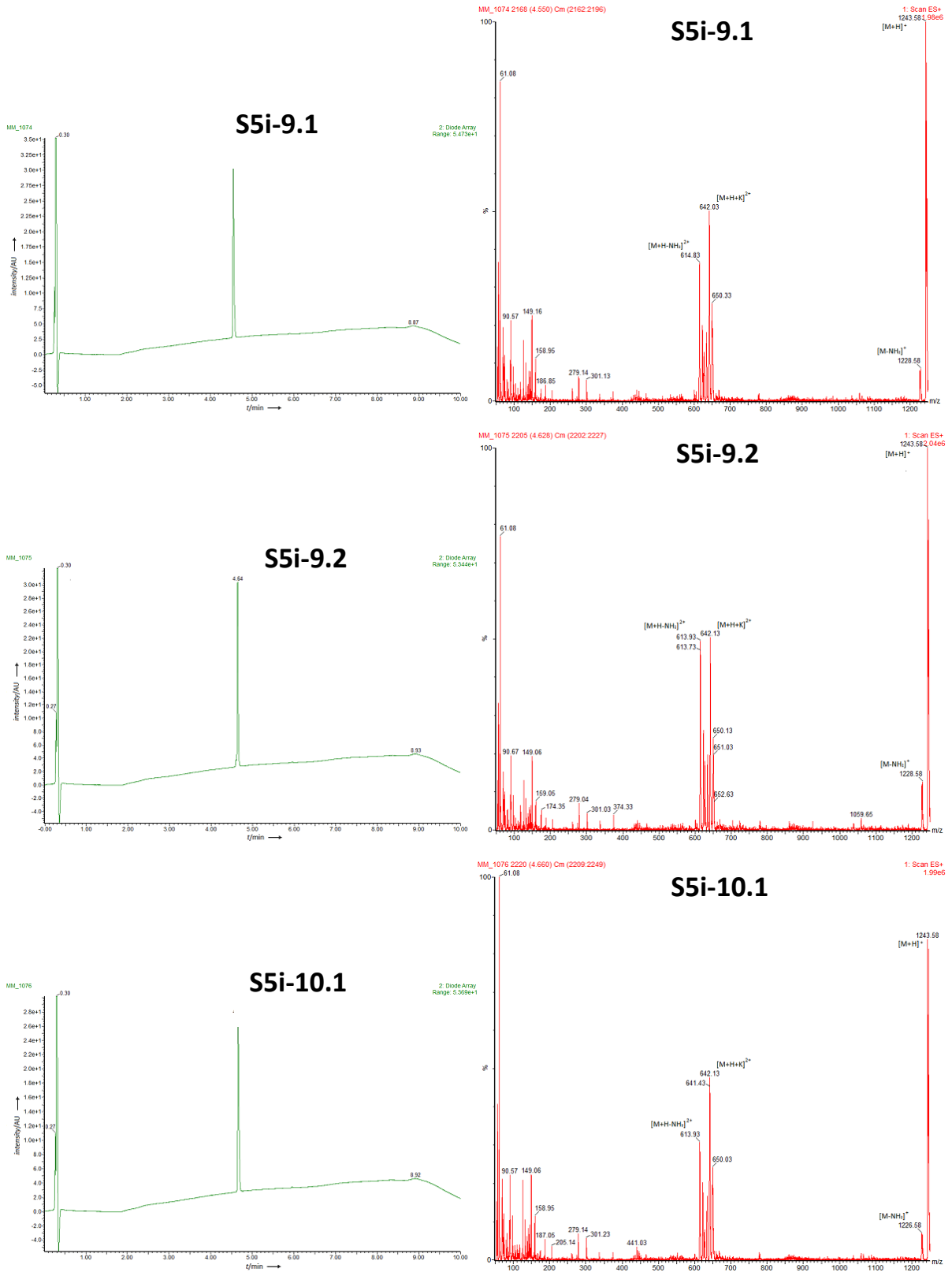


Abbildung S 123: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-9.1 und S5i-9.2 und S5i-10.1

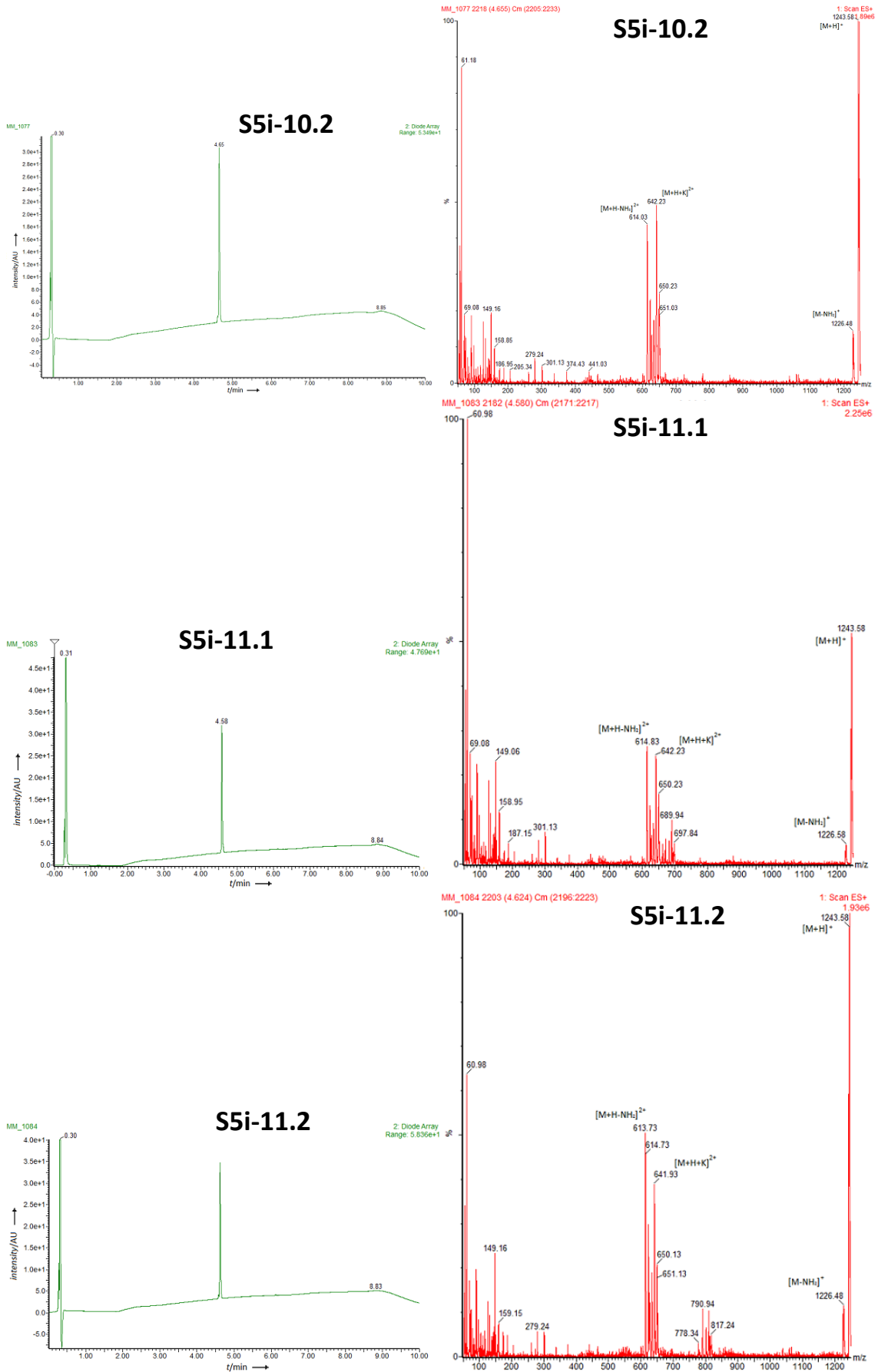


Abbildung S 124: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-10.2 und S5i-11.1 und S5i-11.2

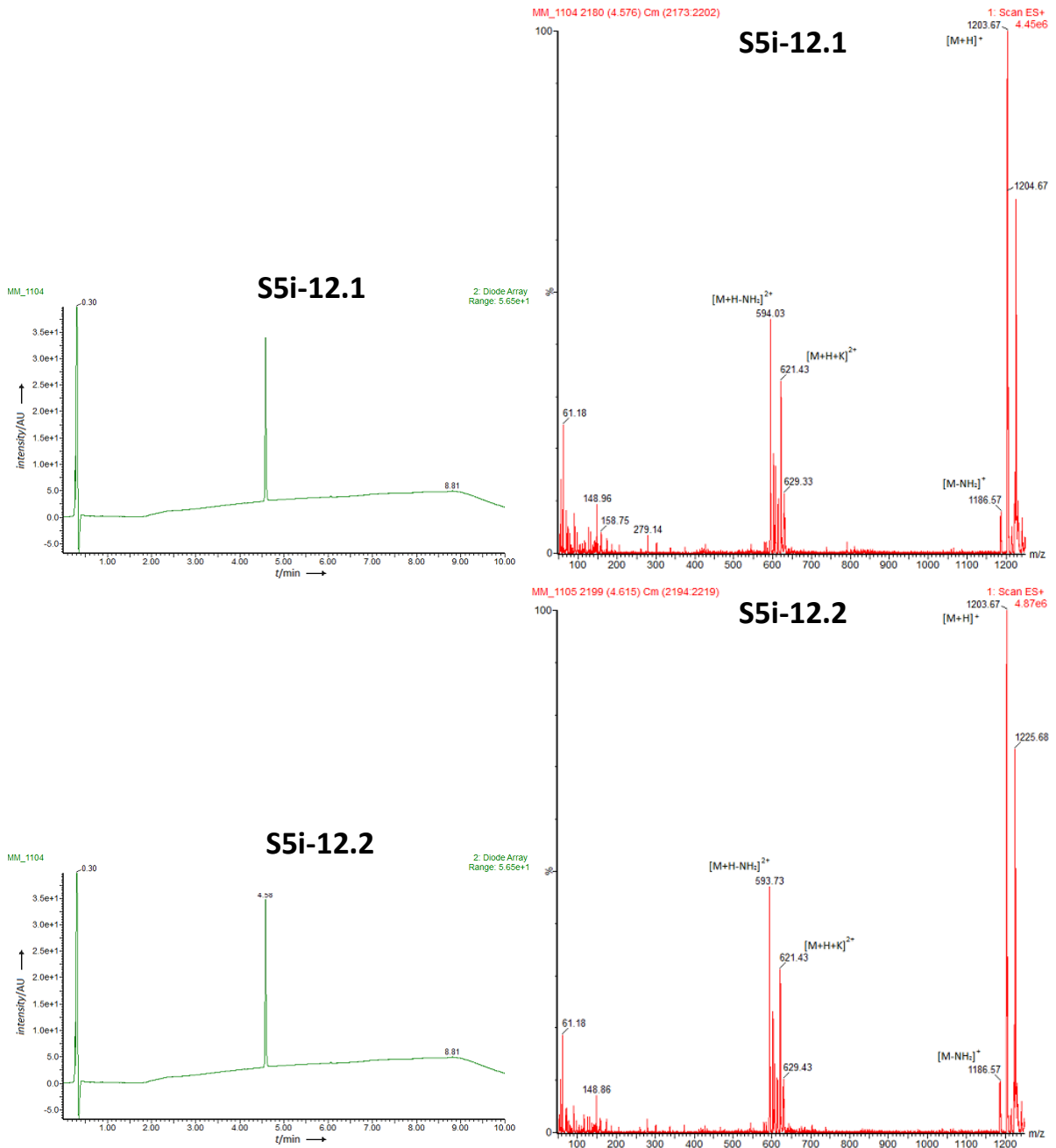


Abbildung S 125: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-12.1 und S5i-12.2

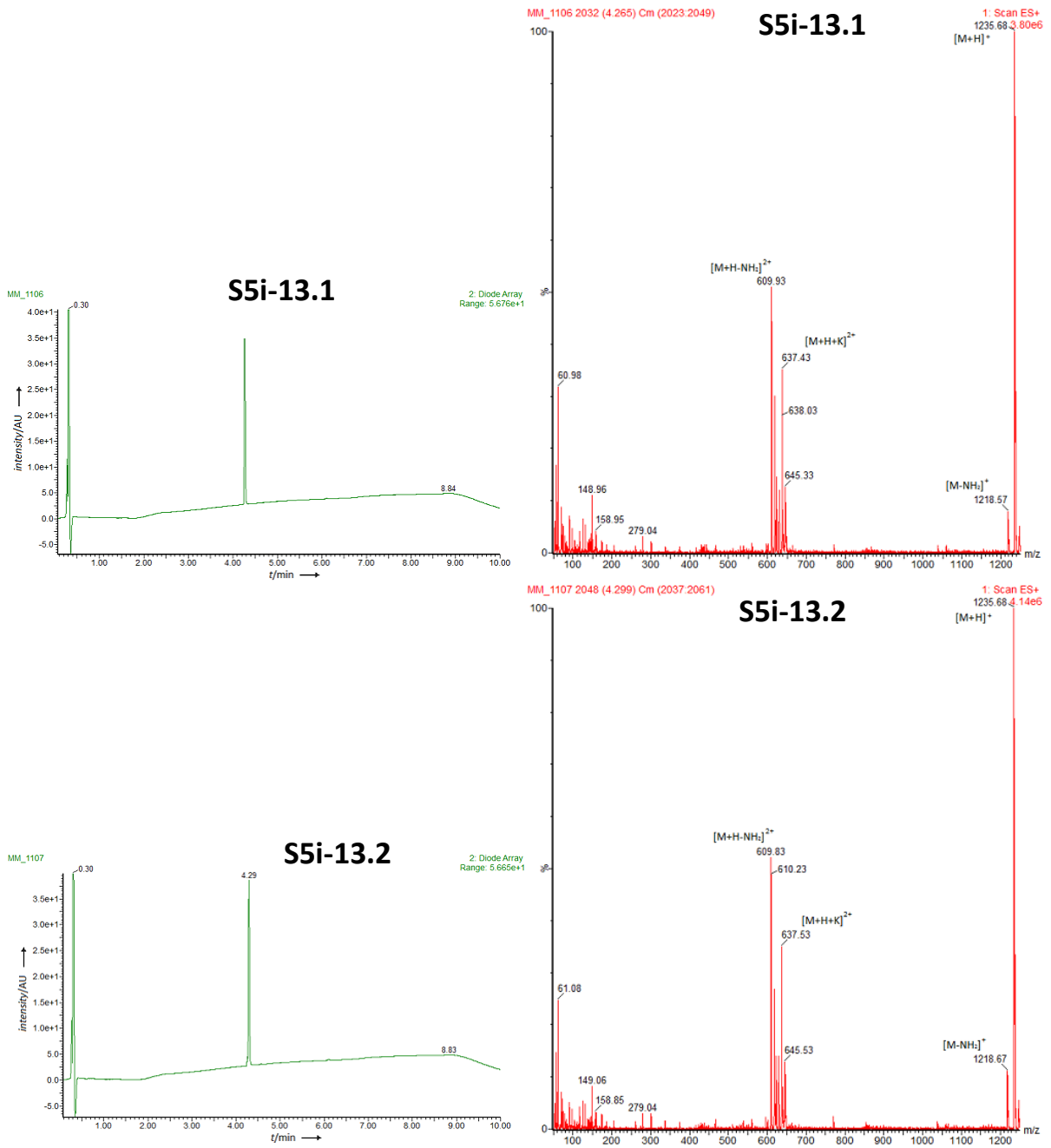


Abbildung S 126: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-13.1 und S5i-13.2

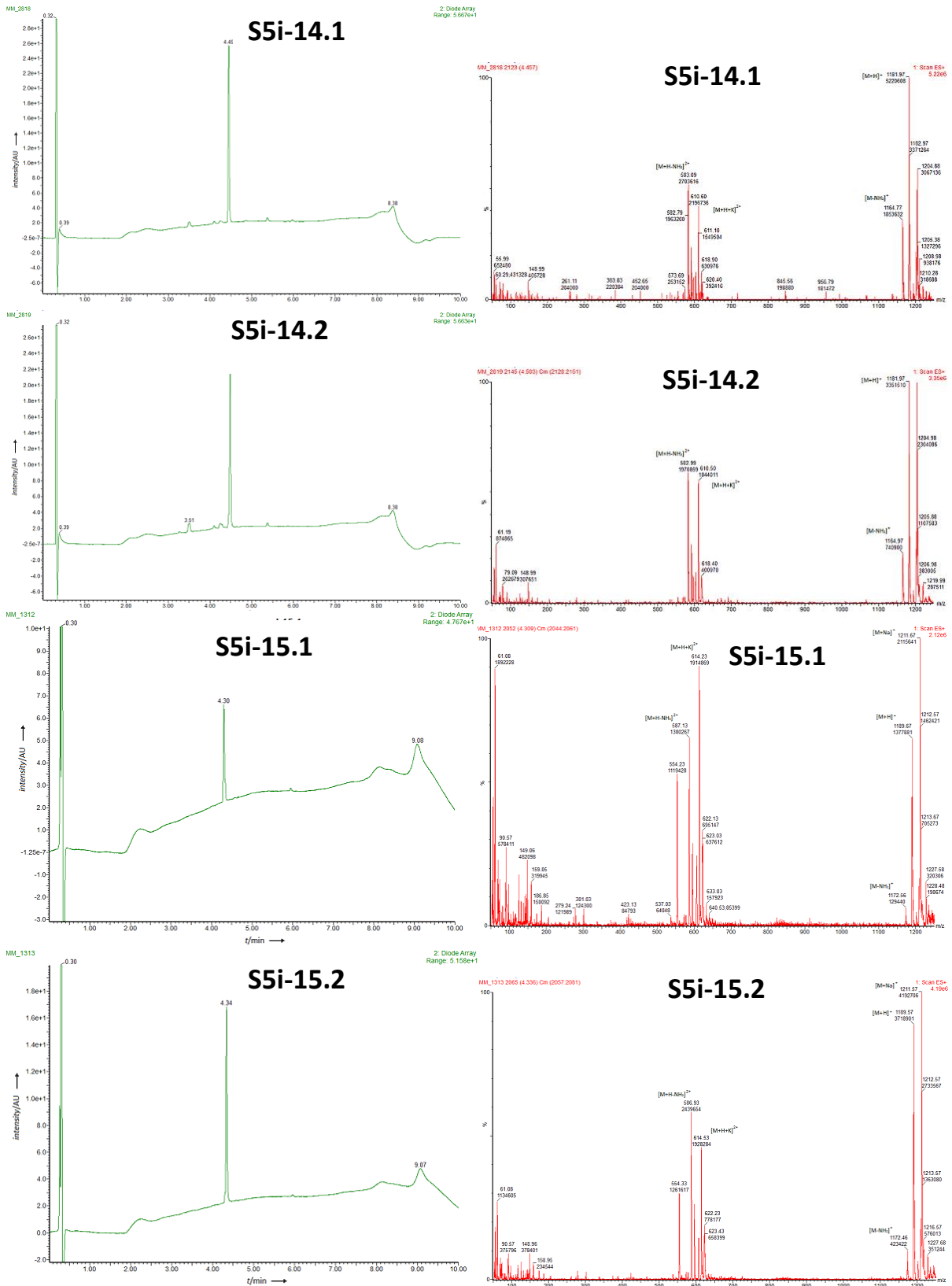


Abbildung S 127: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-14.1 und S5i-14.2 und S5i-15.1 und S5i-15.2

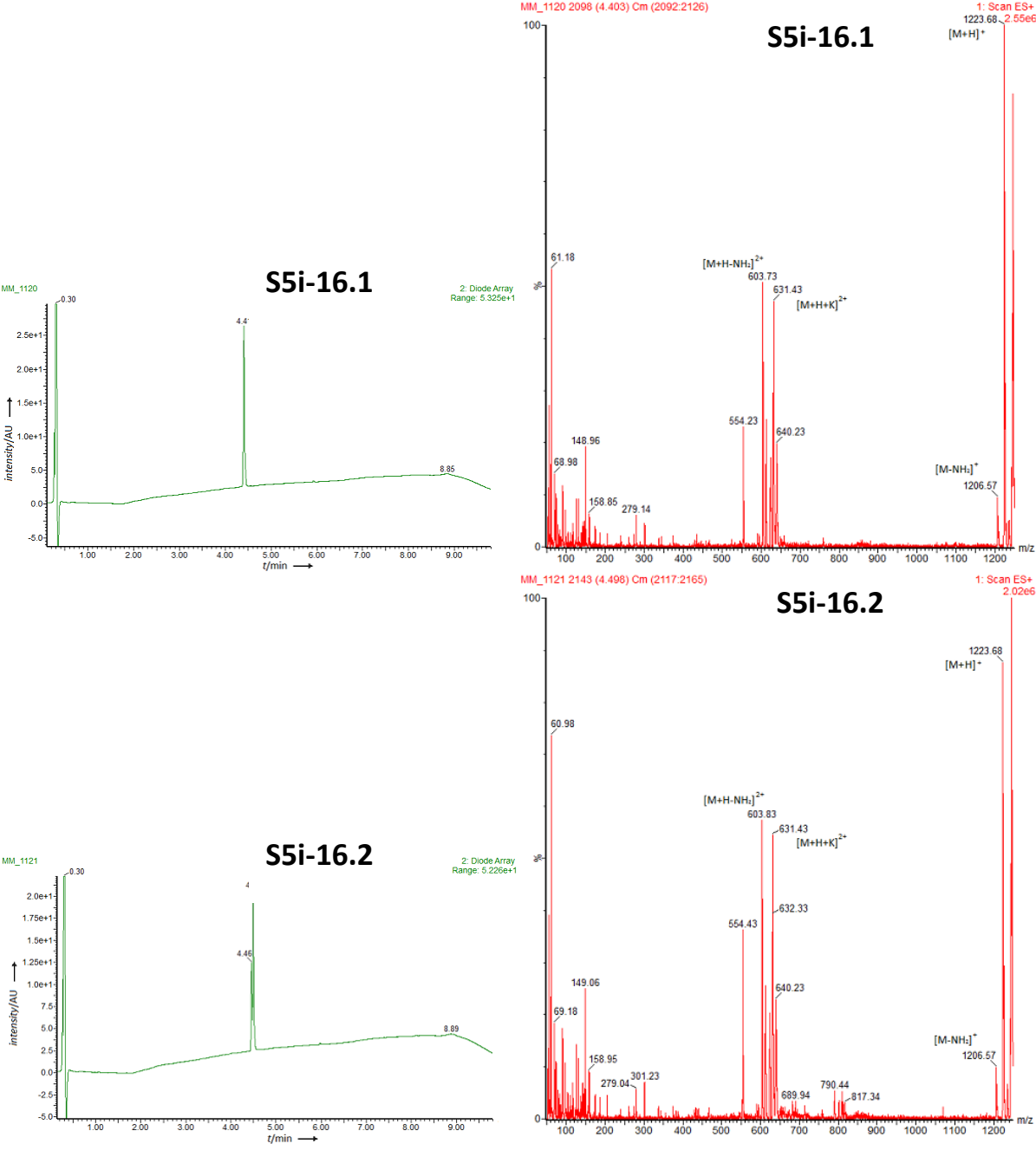


Abbildung S 128: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-16.1 und S5i-16.2

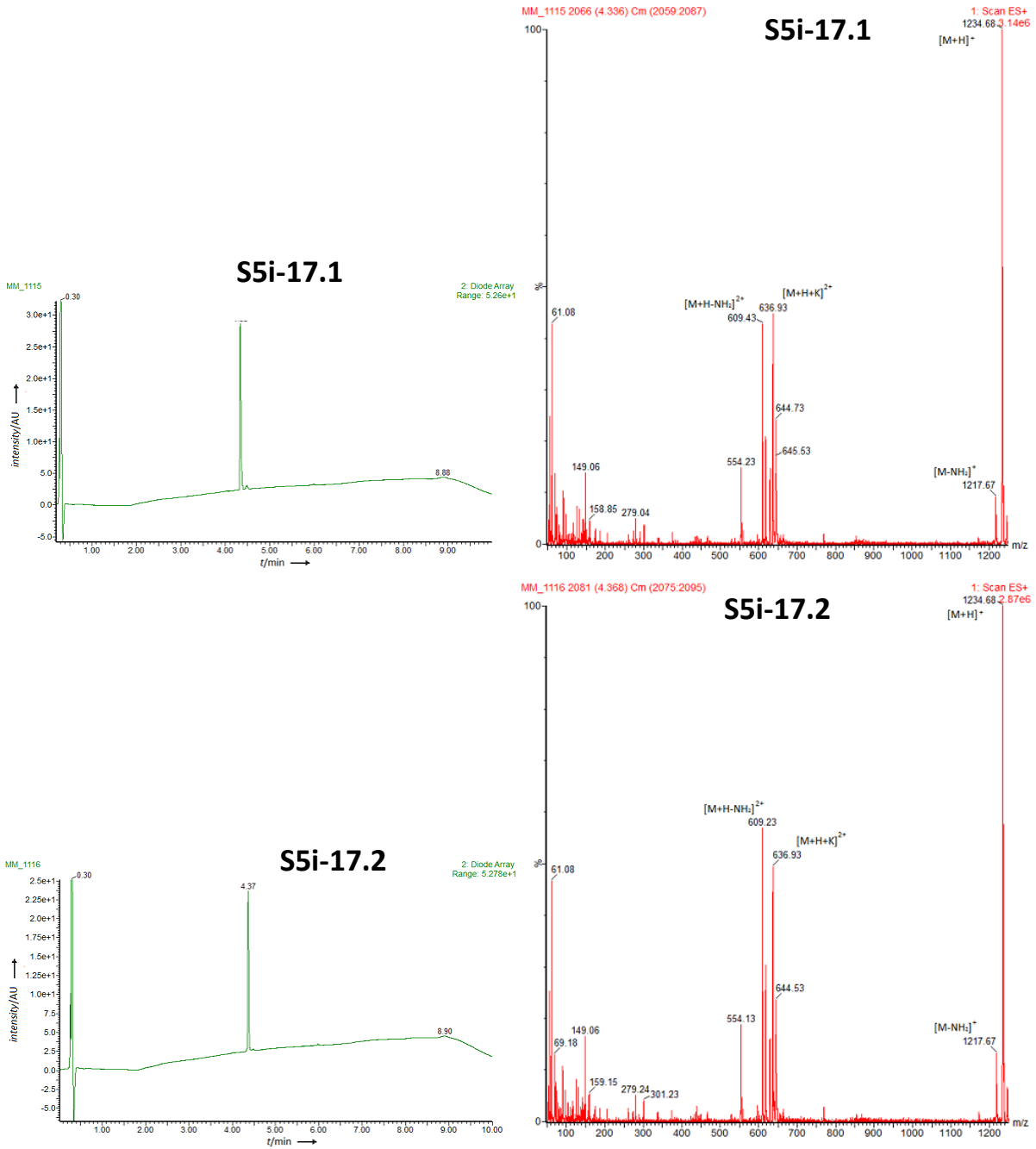


Abbildung S 129: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-17.1 und S5i-17.2

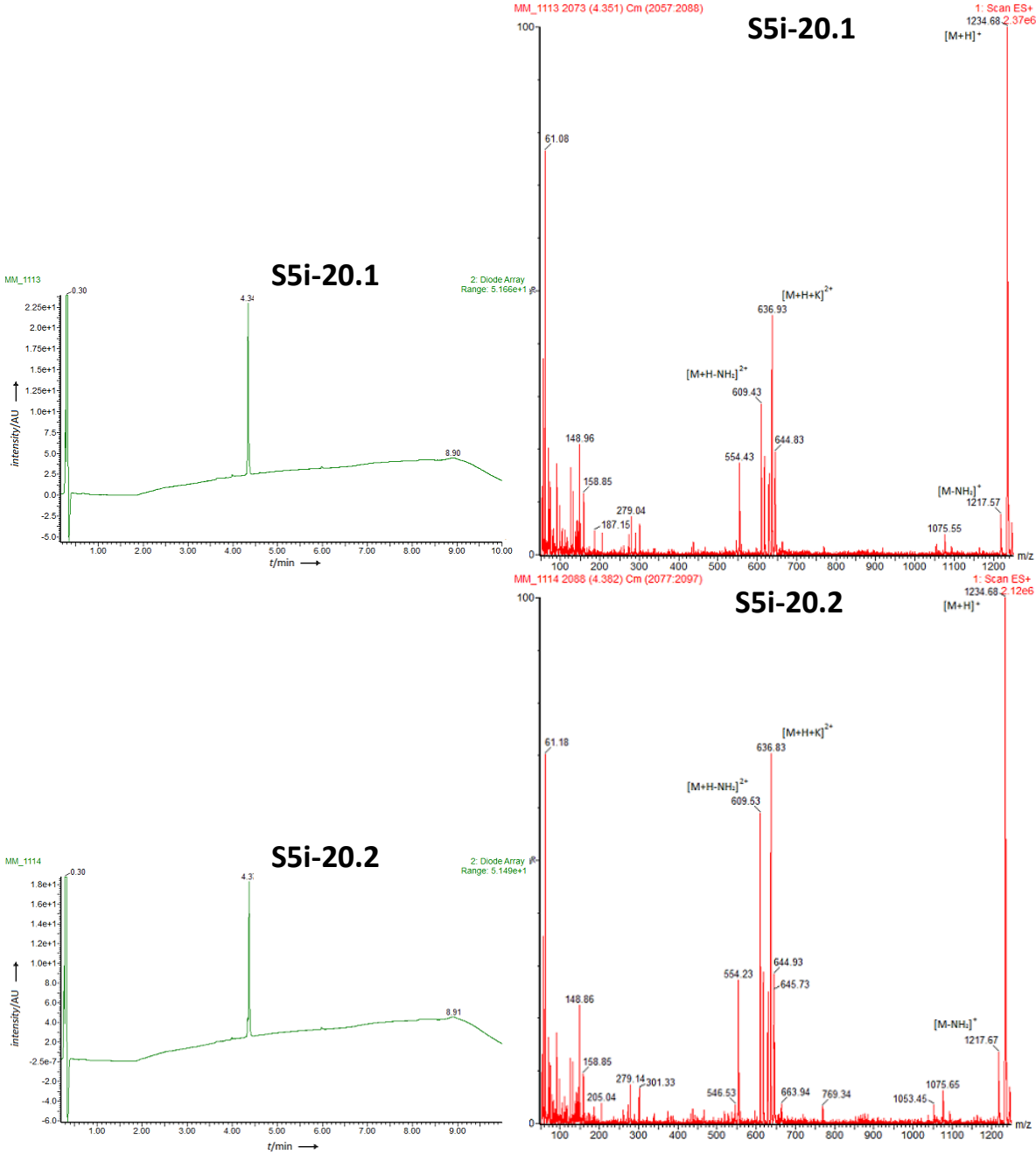


Abbildung S 131: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-20.1 und S5i-20.2

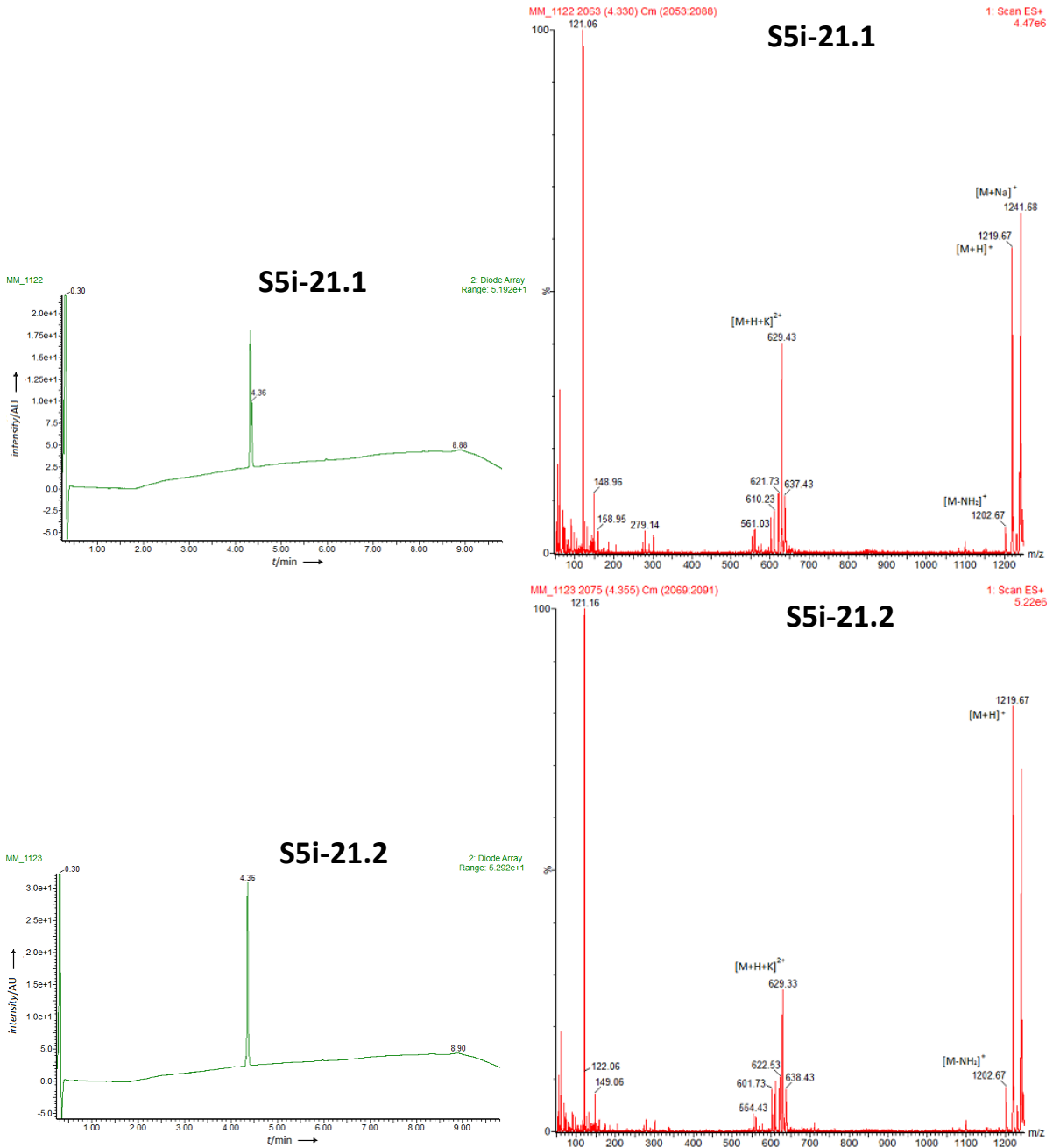


Abbildung S 132: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-21.1 und S5i-21.2

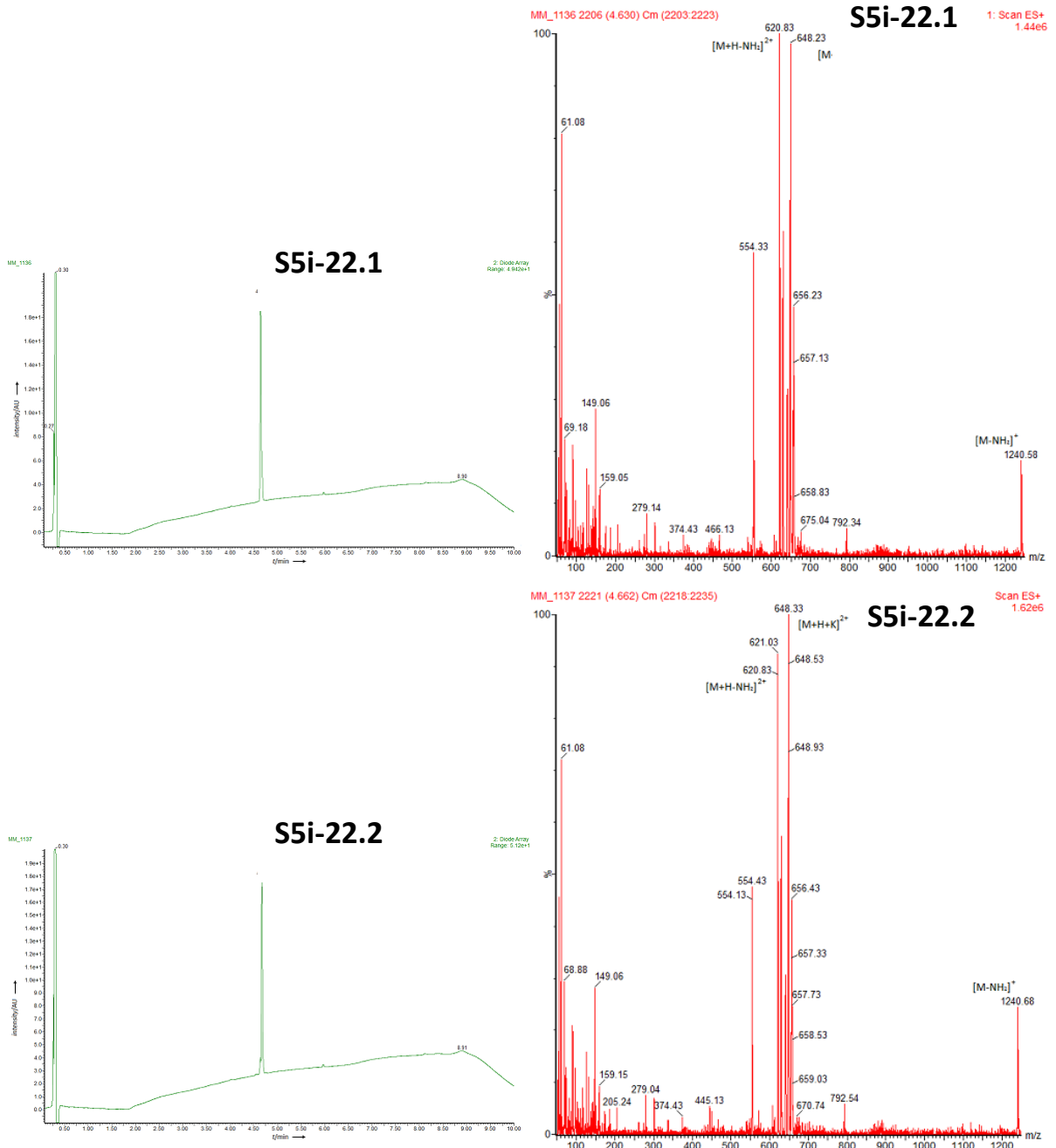


Abbildung S 133: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-22.1 und S5i-22.2

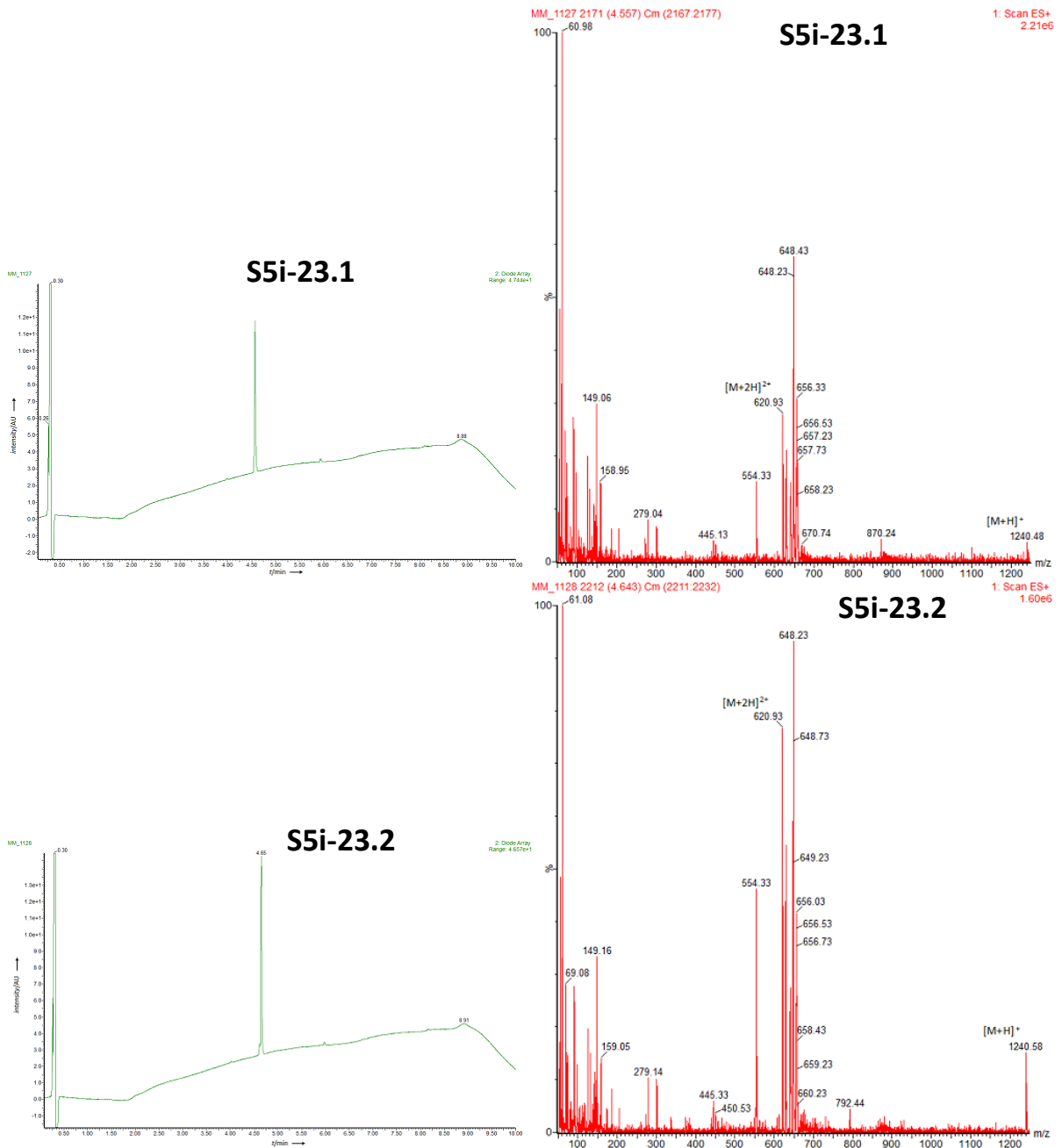


Abbildung S 134: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-23.1 und S5i-23.2

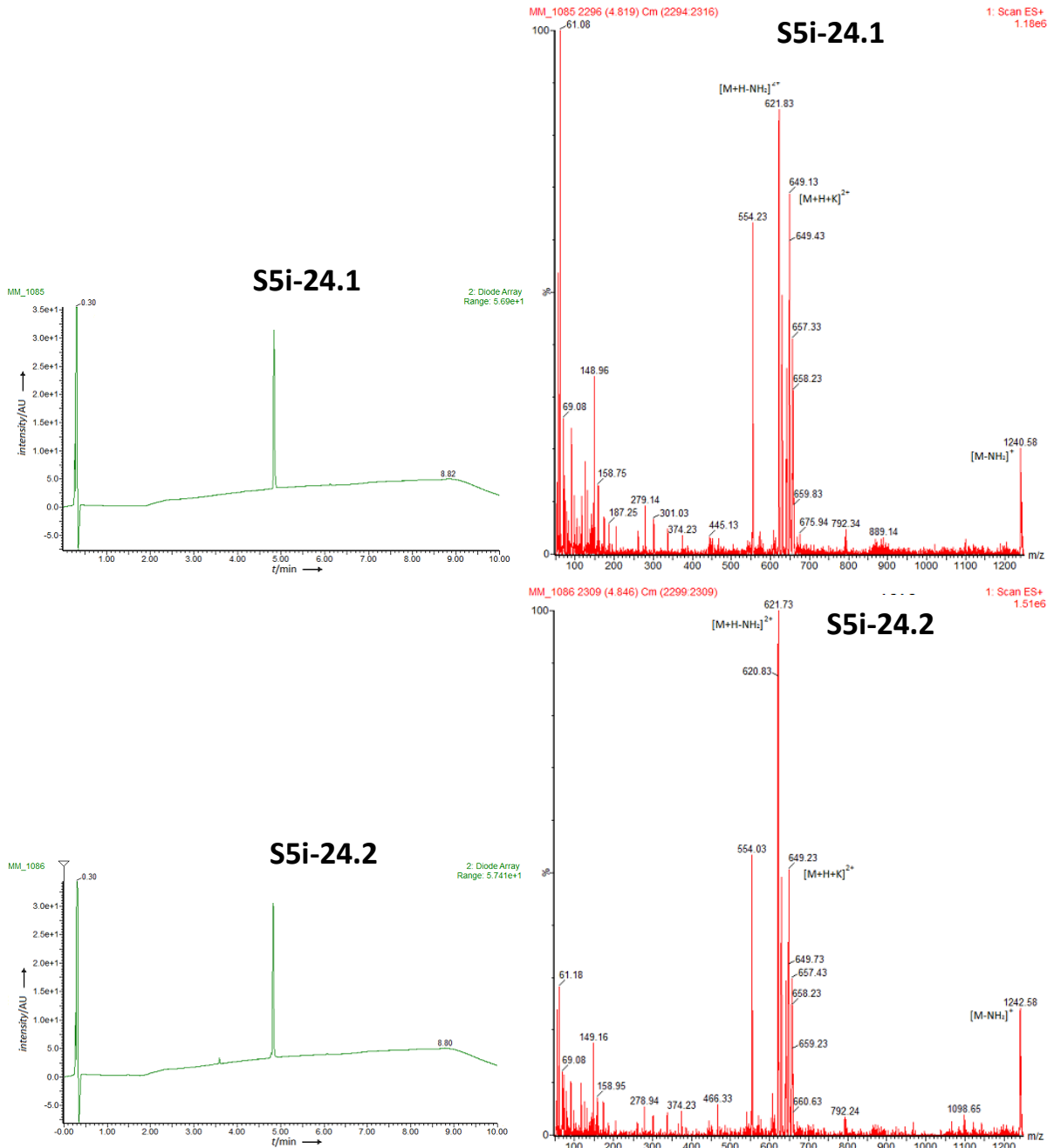


Abbildung S 135: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-24.1 und S5i-24.2

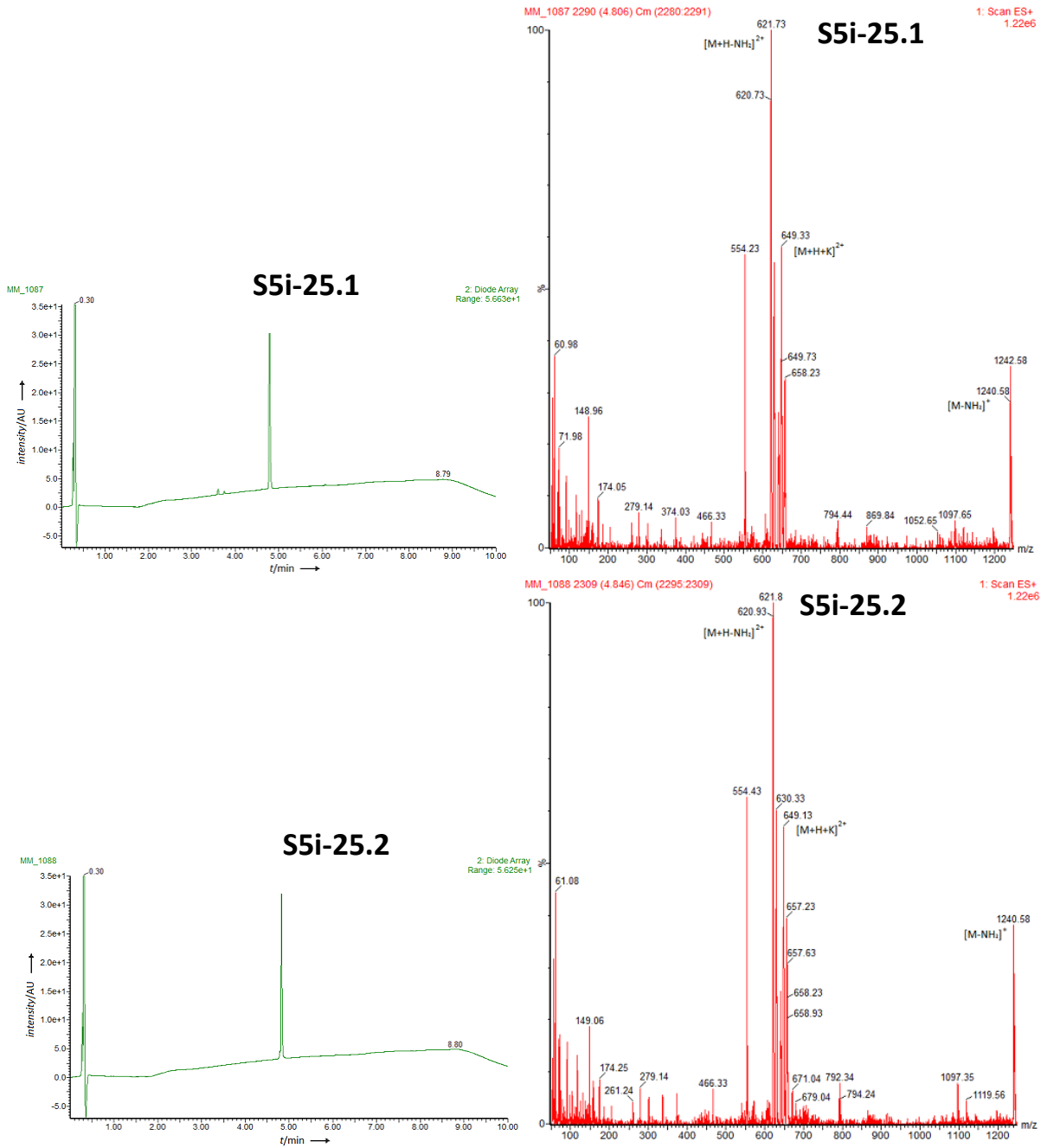


Abbildung S 136: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-25.1 und S5i-25.2

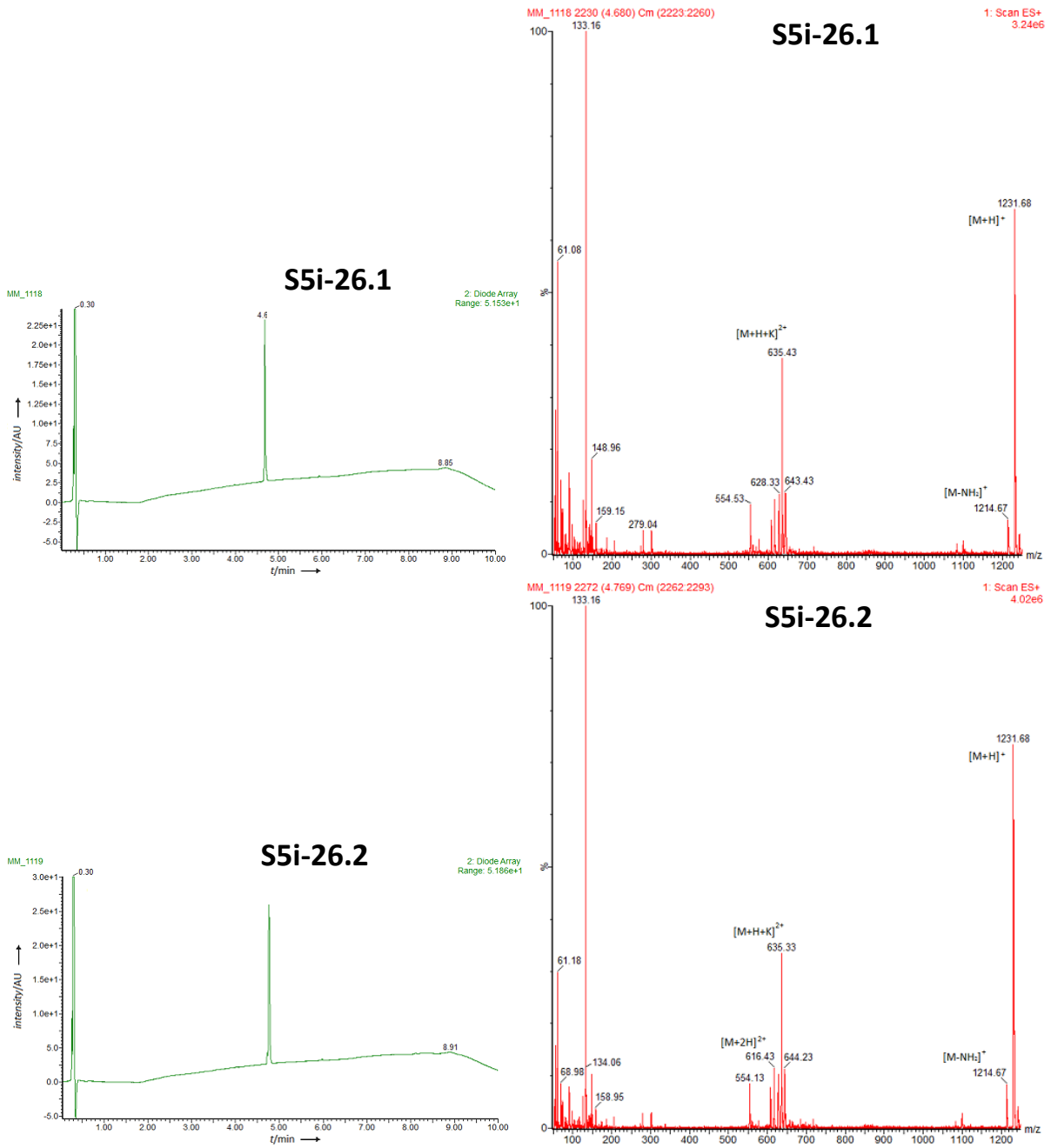


Abbildung S 137: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-26.1 und S5i-26.2

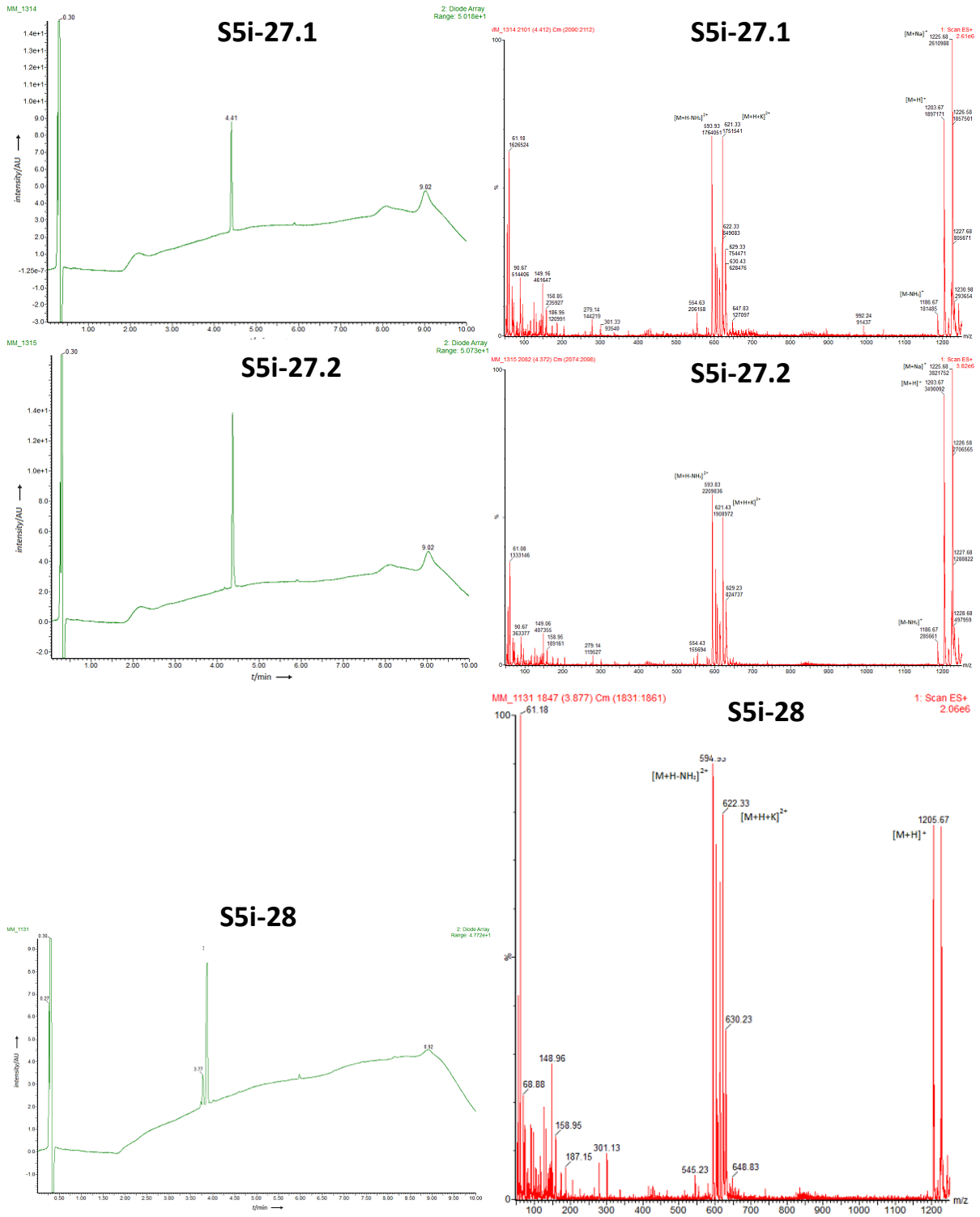


Abbildung S 138: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-27.1 und S5i-27.2 und S5i-28

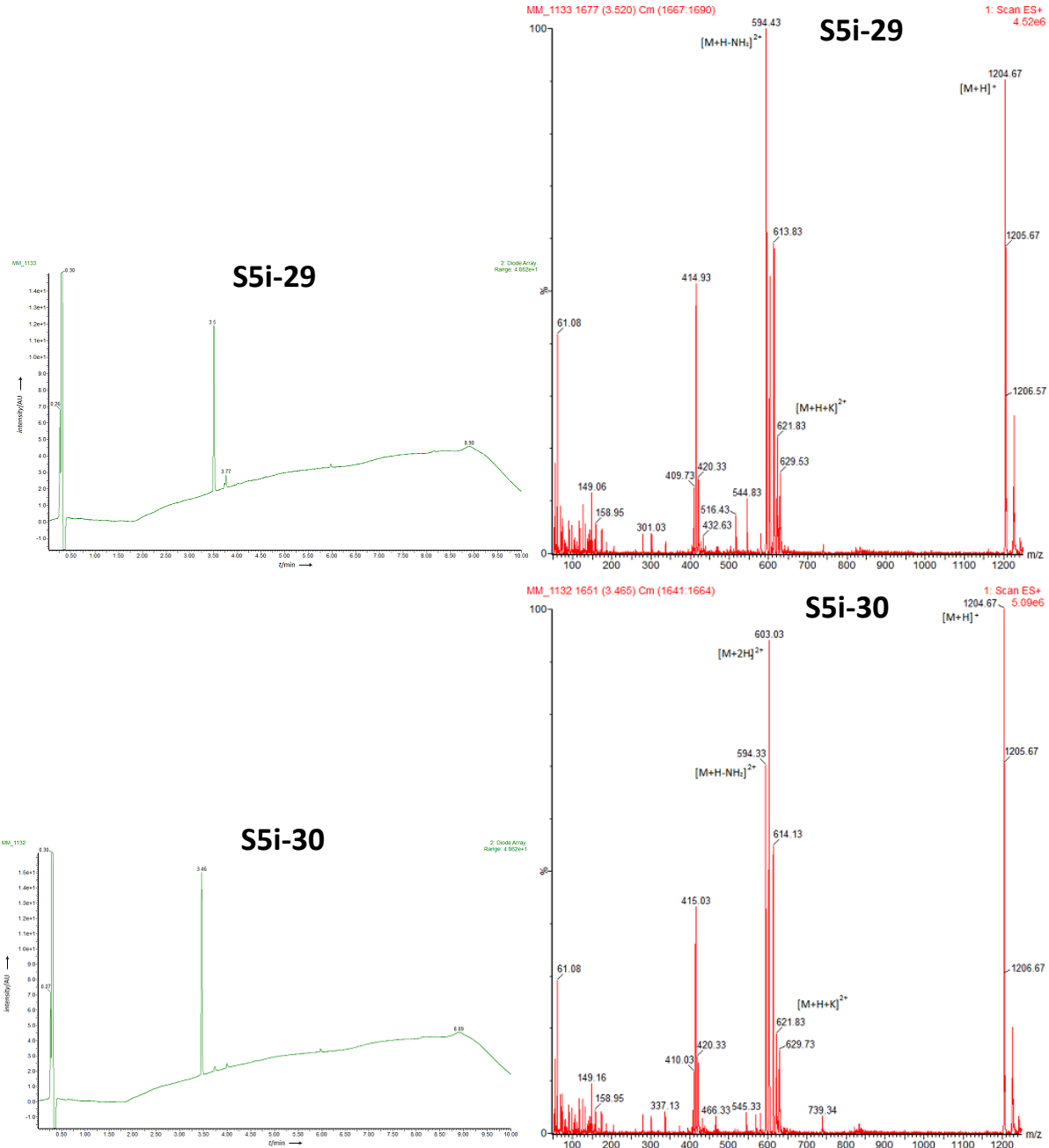


Abbildung S 139: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-29 und S5i-30

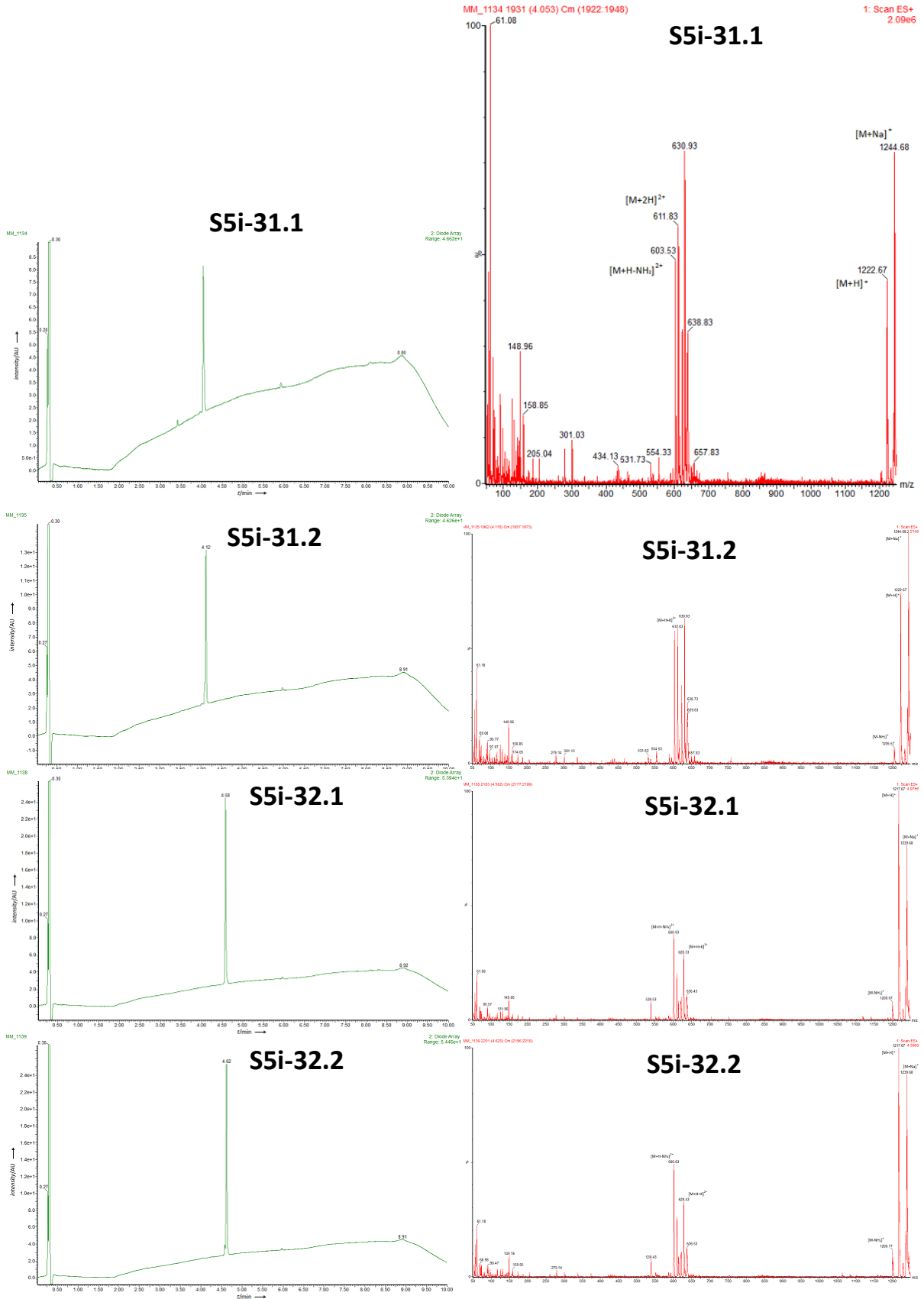


Abbildung S 140: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-31.1 und S5i-31.2 und S5i-32.1 und S5i-32.2

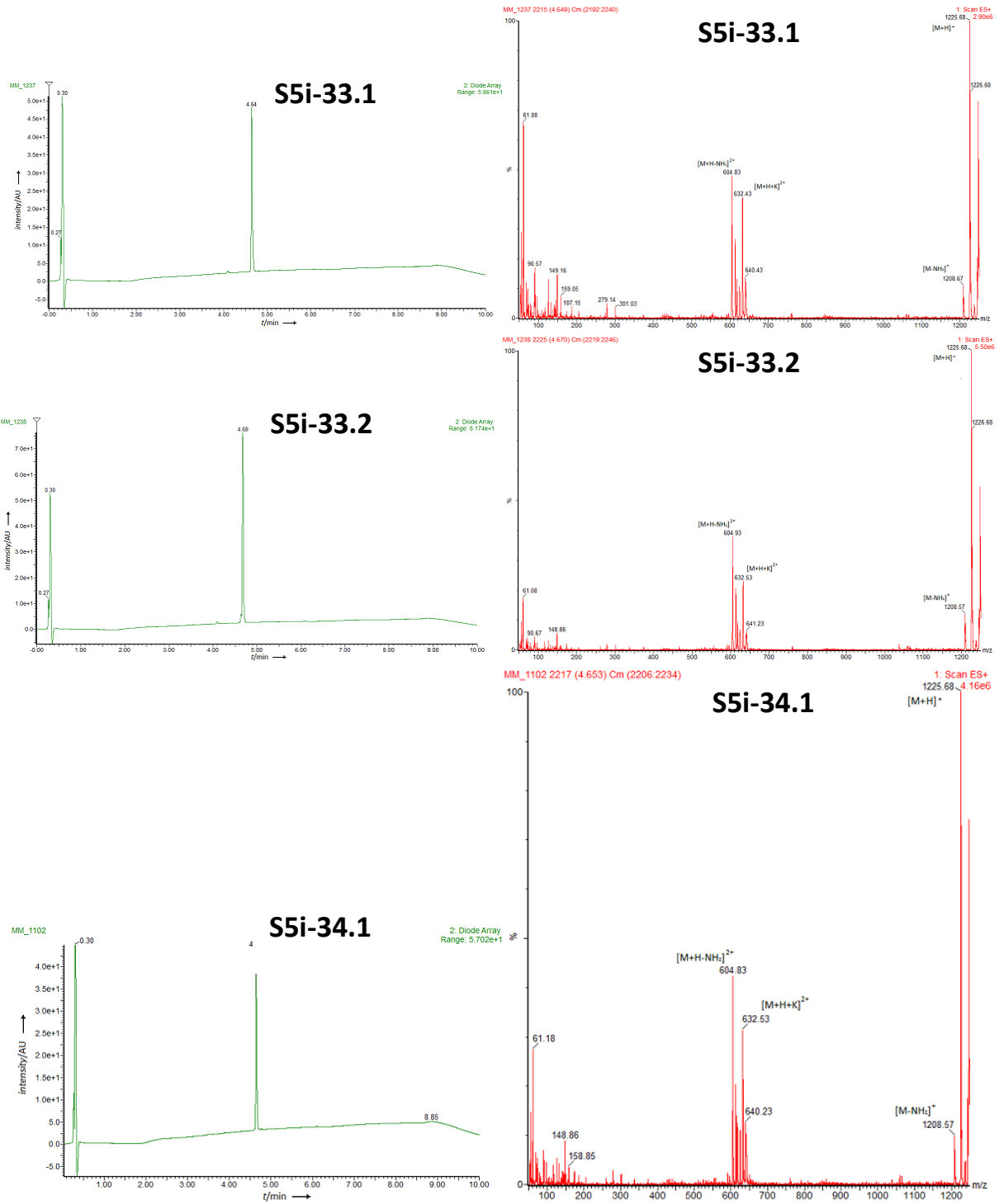


Abbildung S 141: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-33.1 und S5i-33.2 und S5i-34.1

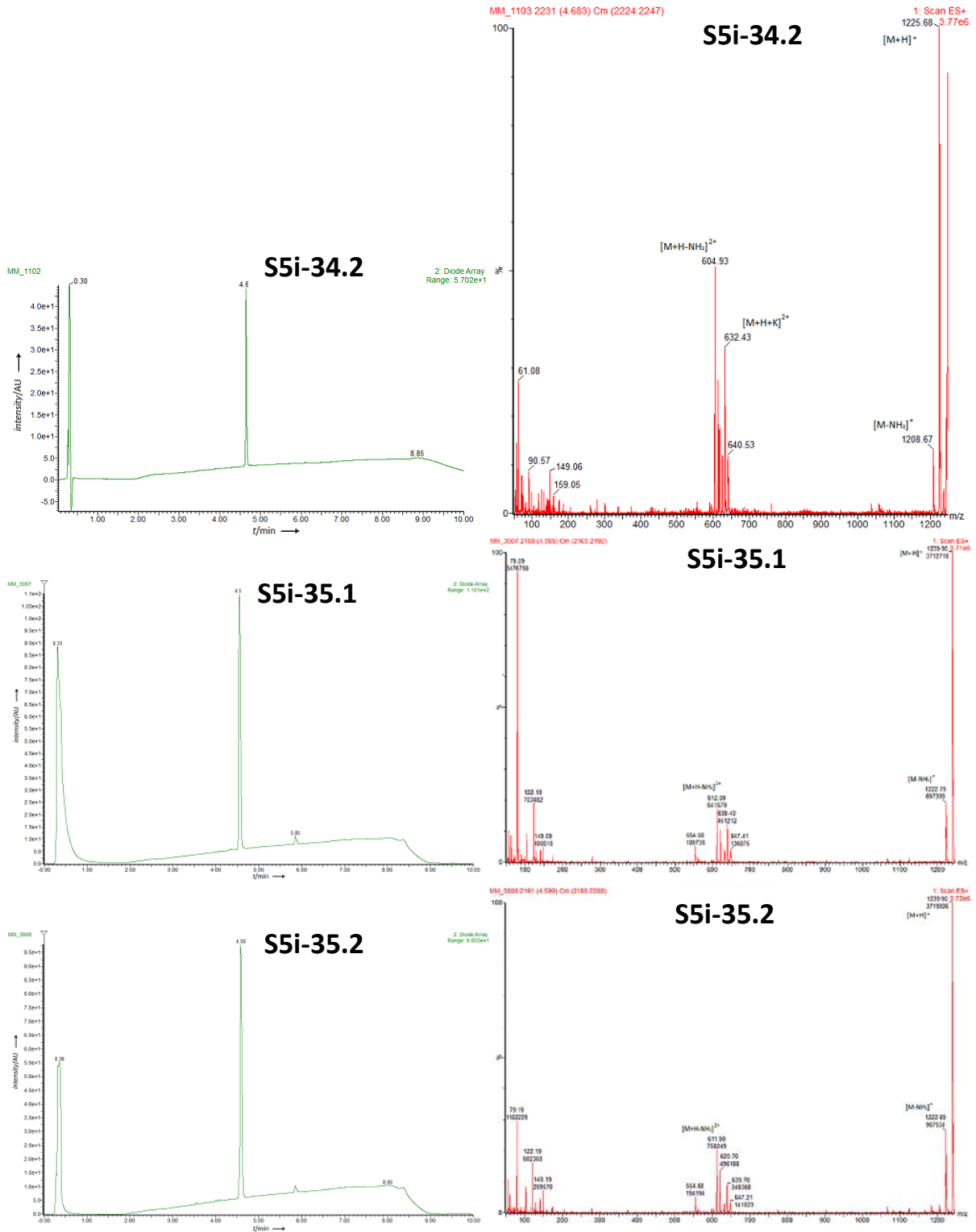


Abbildung S 142: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-34.2 und S5i-35.1 und S5i-35.2

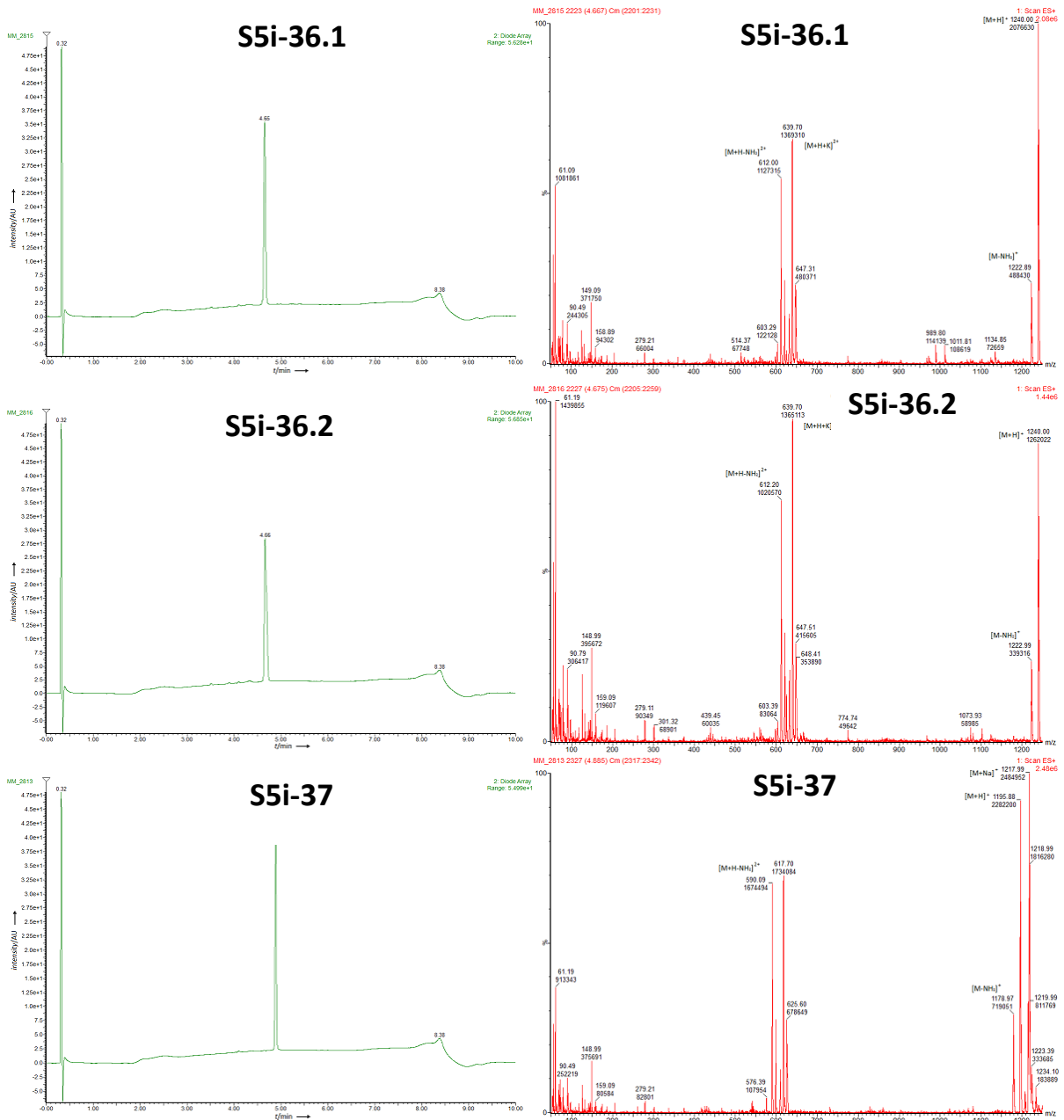


Abbildung S 143: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-36.1 und S5i-36.2 und S5i-37

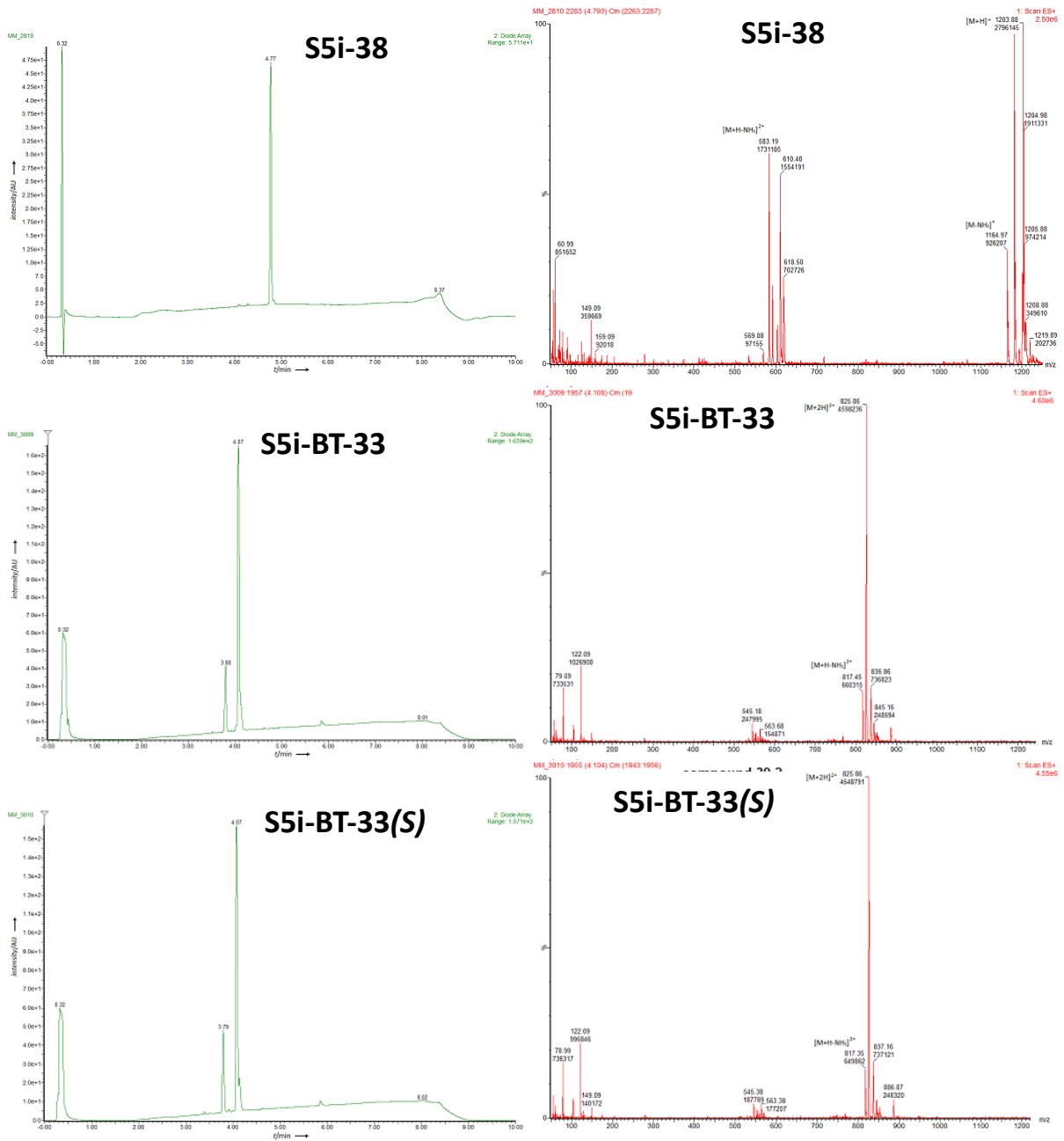


Abbildung S 144: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-38 und S5i-BT-33 und S5i-BT33(S)

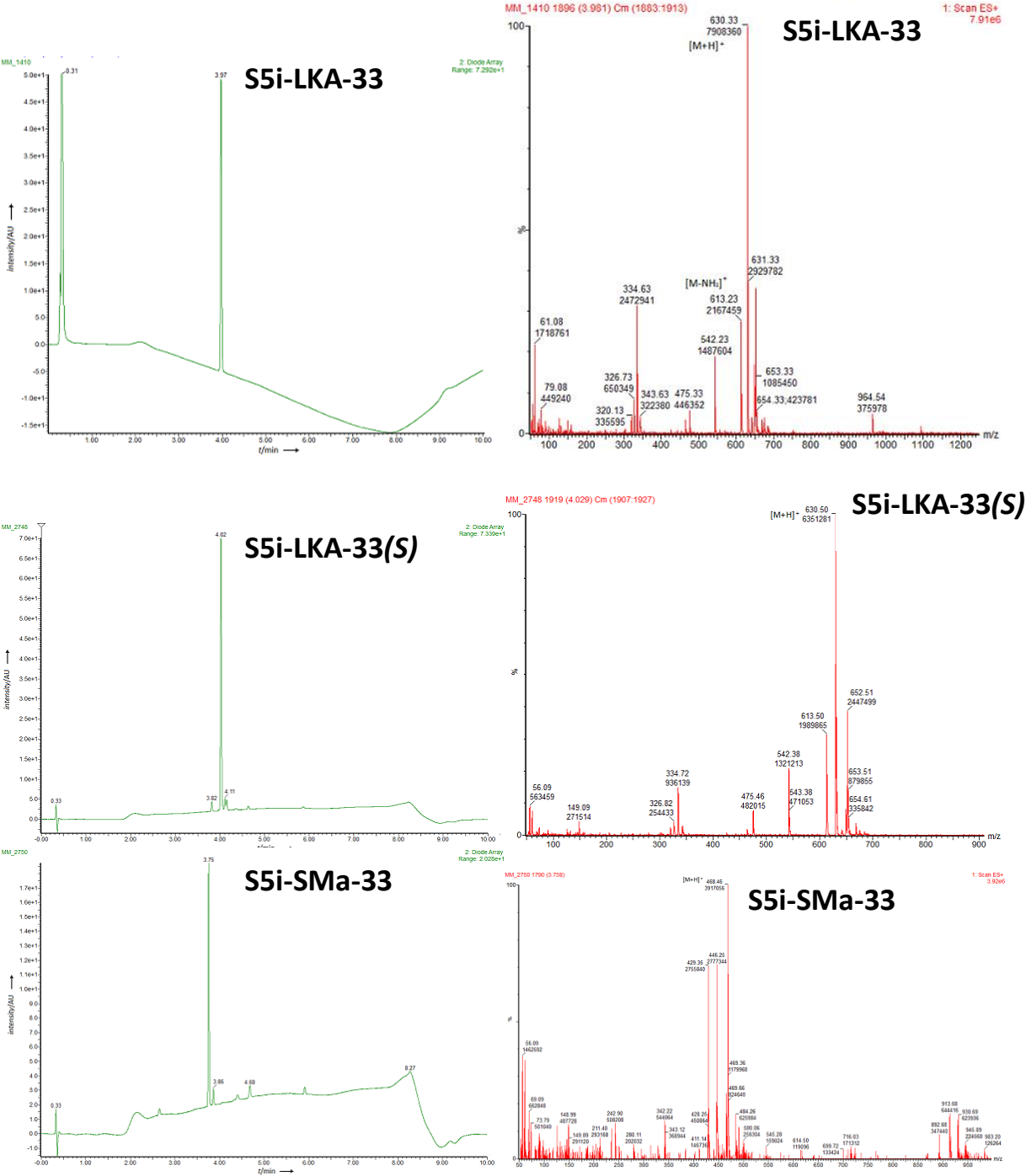


Abbildung S 145: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-LKA-33 und S5i-LKA-33(S) und S5i-SMa-33

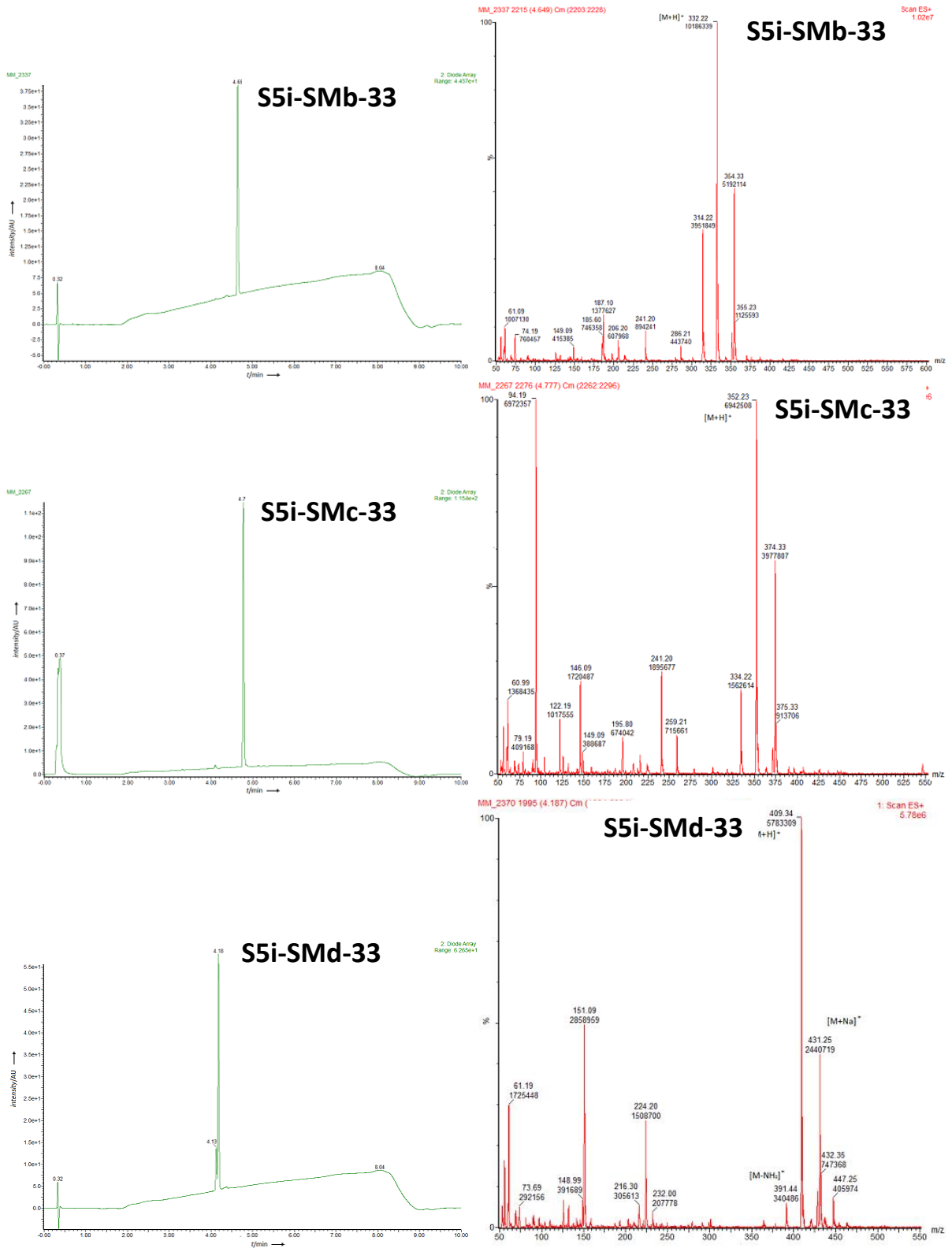


Abbildung S 146: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-SMb-33 und S5i-SMc-33 und S5i-SMd-33

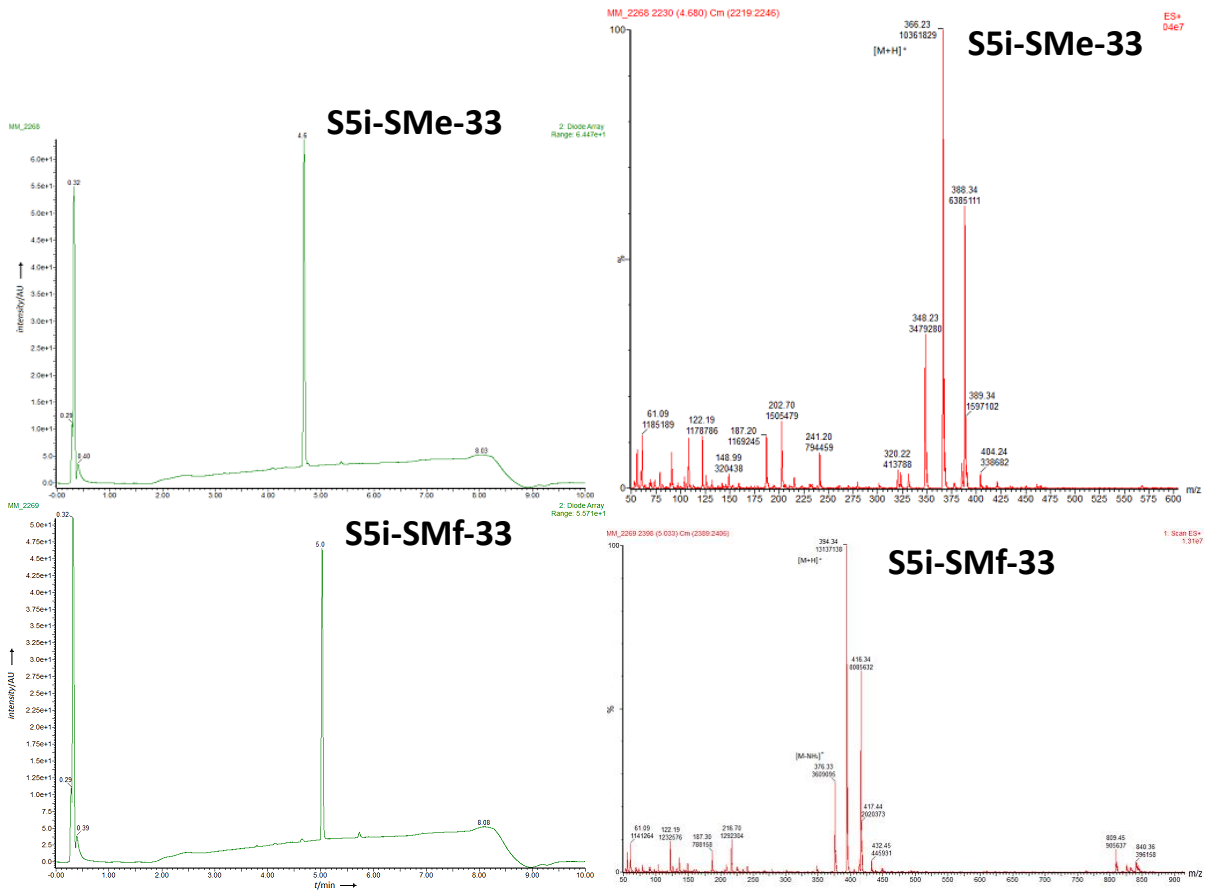


Abbildung S 147: UPLC-MS der Inhibitoren S5i-SMe-33 und S5i-SMf-33

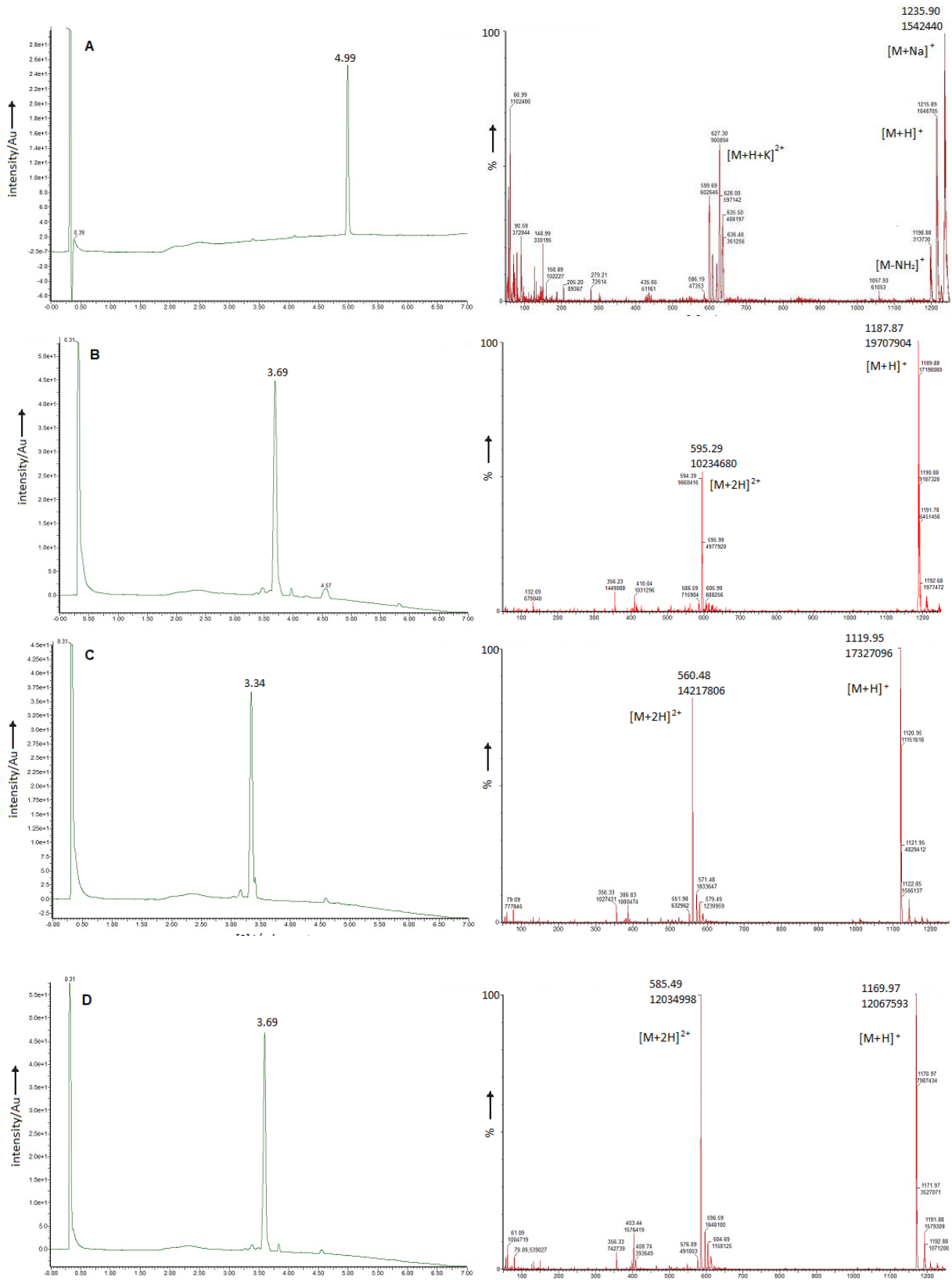


Abbildung S 148: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S5i-8 [B] S2i-a [C] S2i-b und [D] S2i-c

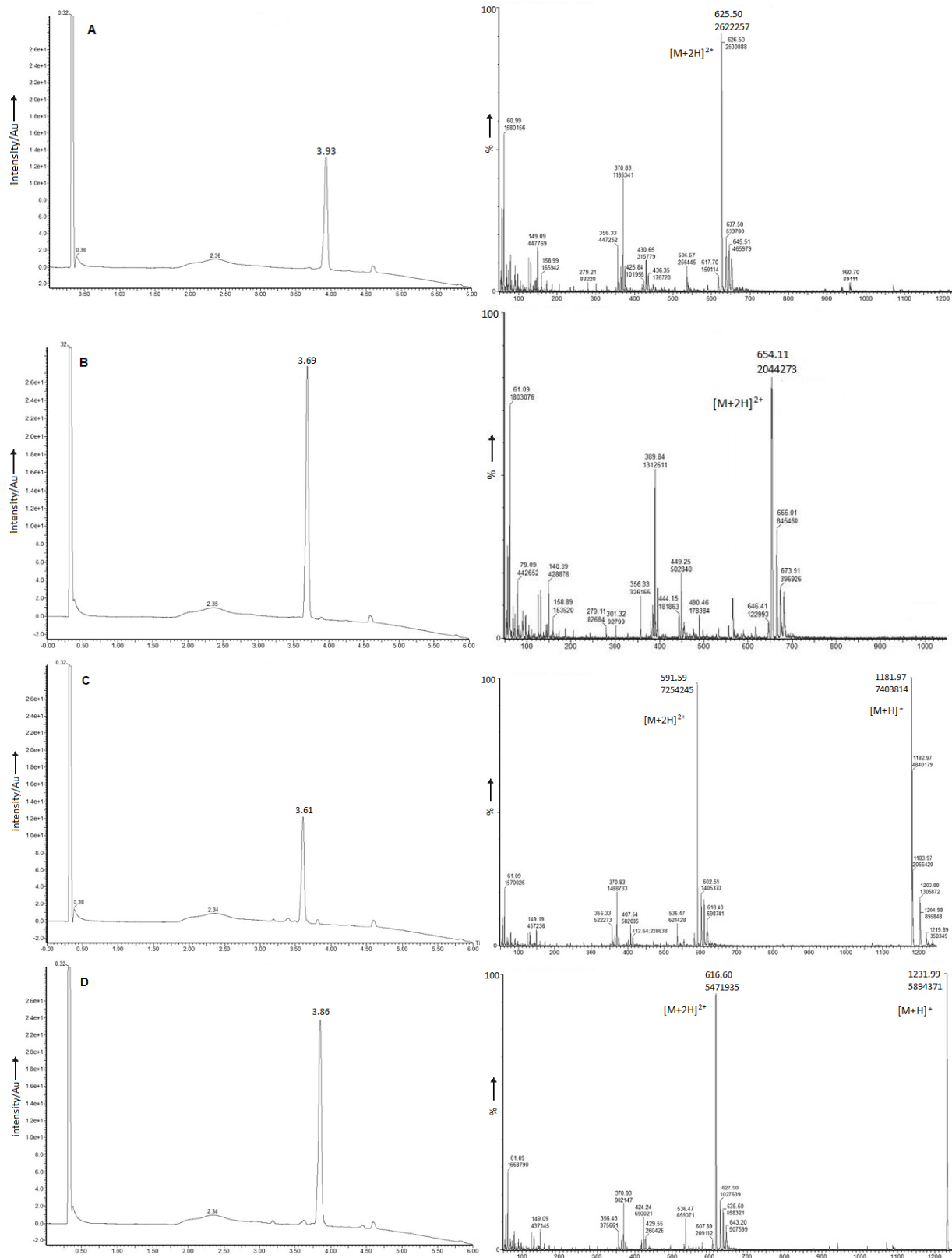


Abbildung S 149: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-d [B] S2i-e [C] S2i-f und [D] S2i-g

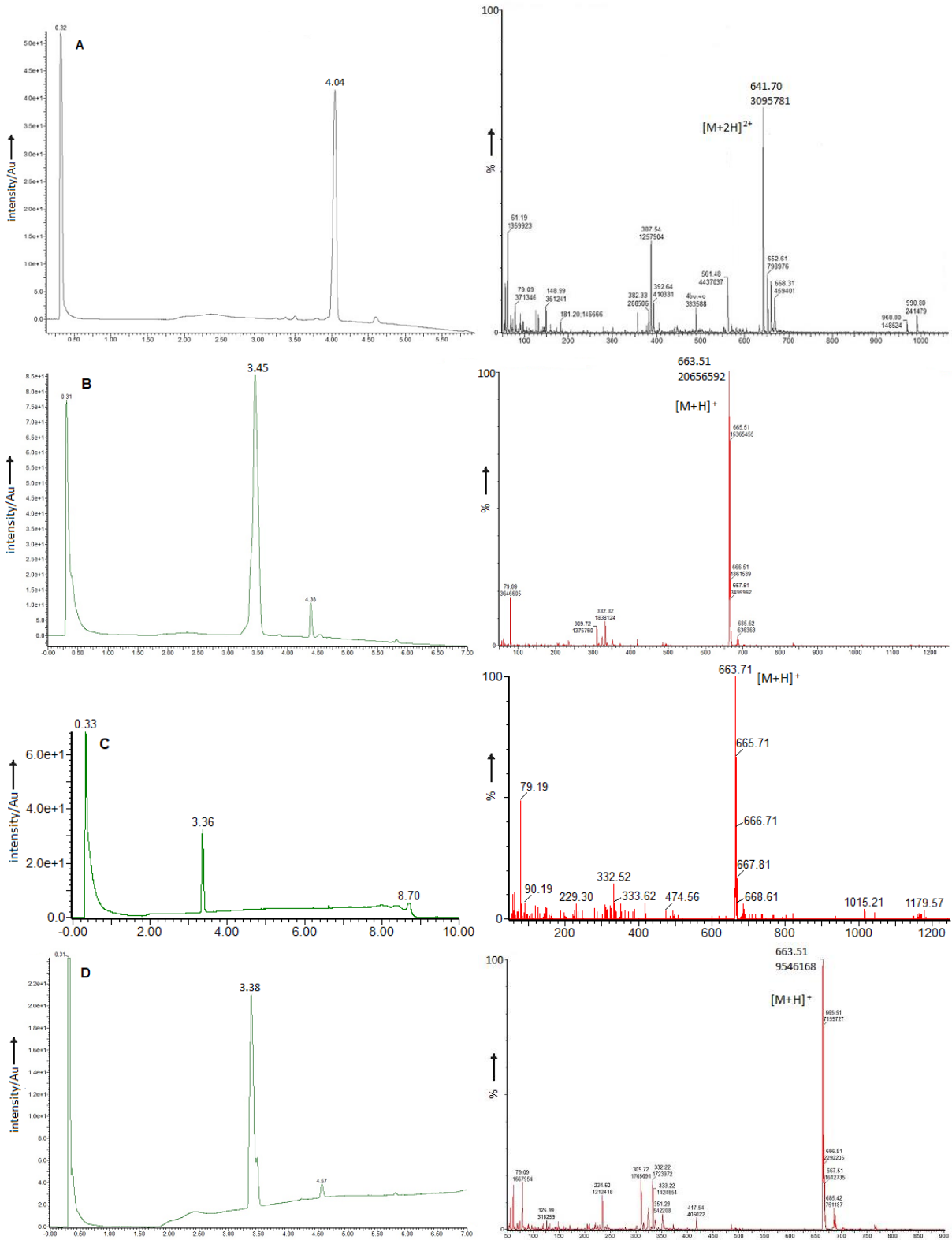


Abbildung S 150: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-h [B] S2i-1 [C] S2i-1(S) und [D] S2i-2

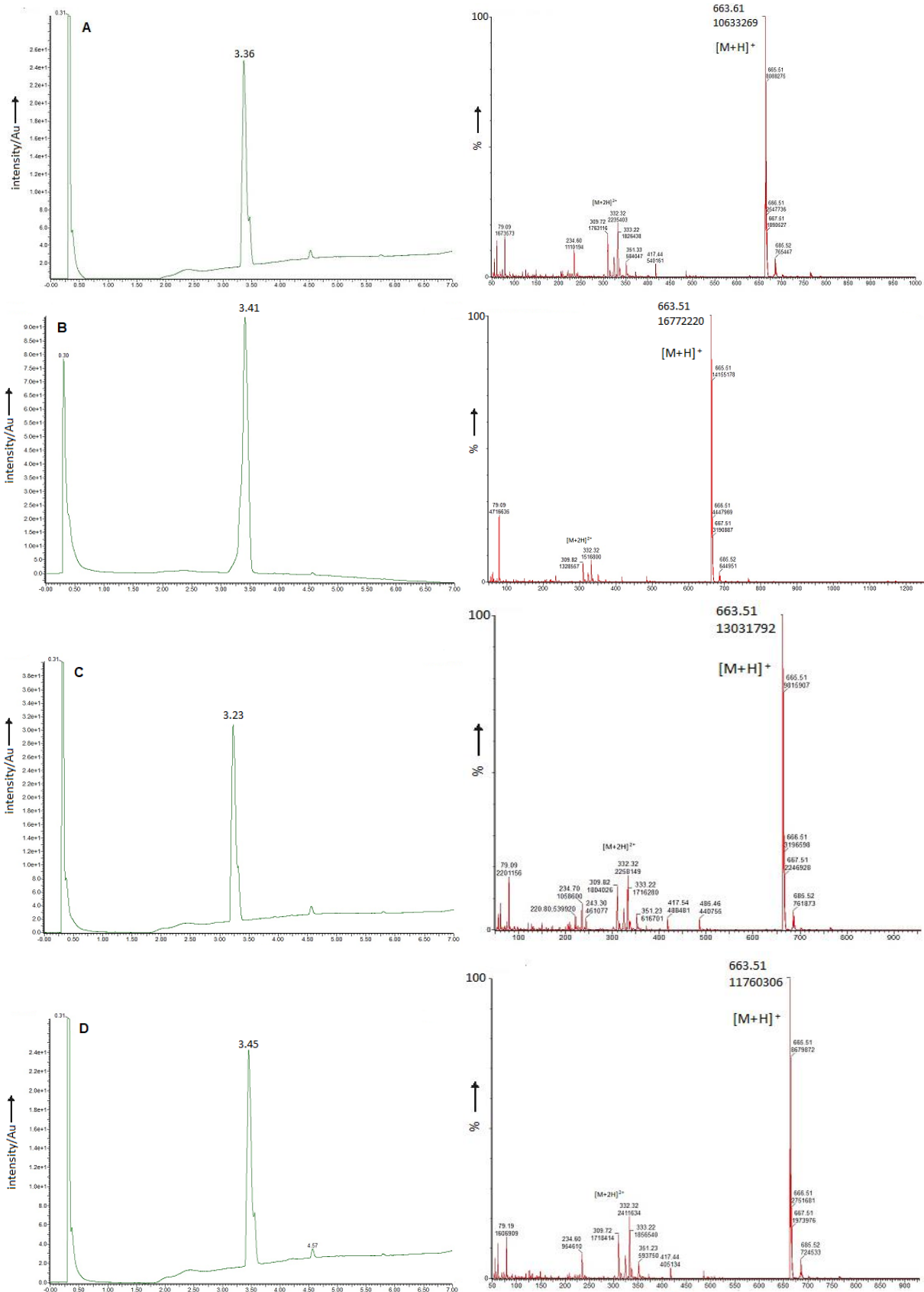


Abbildung S 151: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-3 [B] S2i-4 [C] S2i-5 und [D] S2i-6

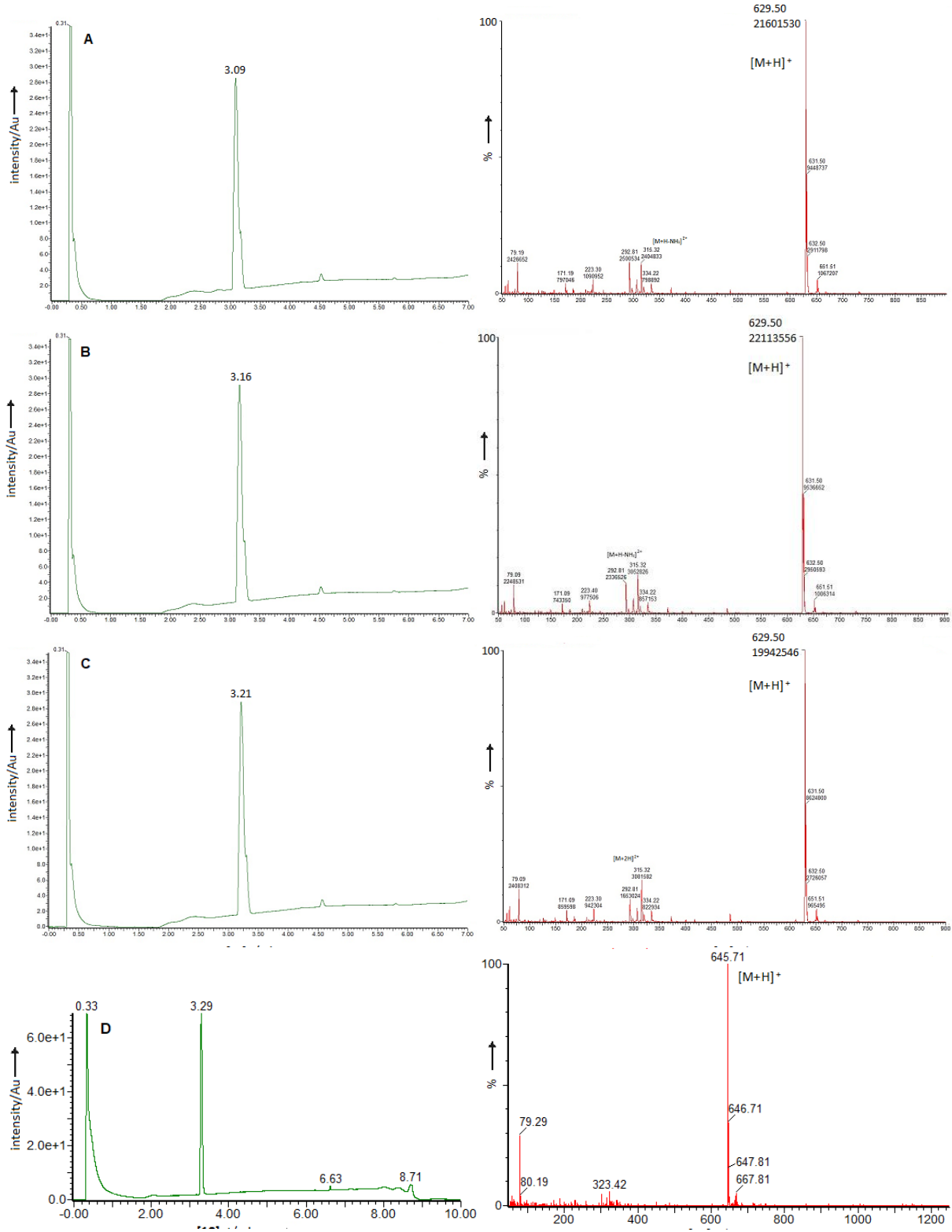


Abbildung S 152: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-7 [B] S2i-8 [C] S2i-9 und [D] S2i-10

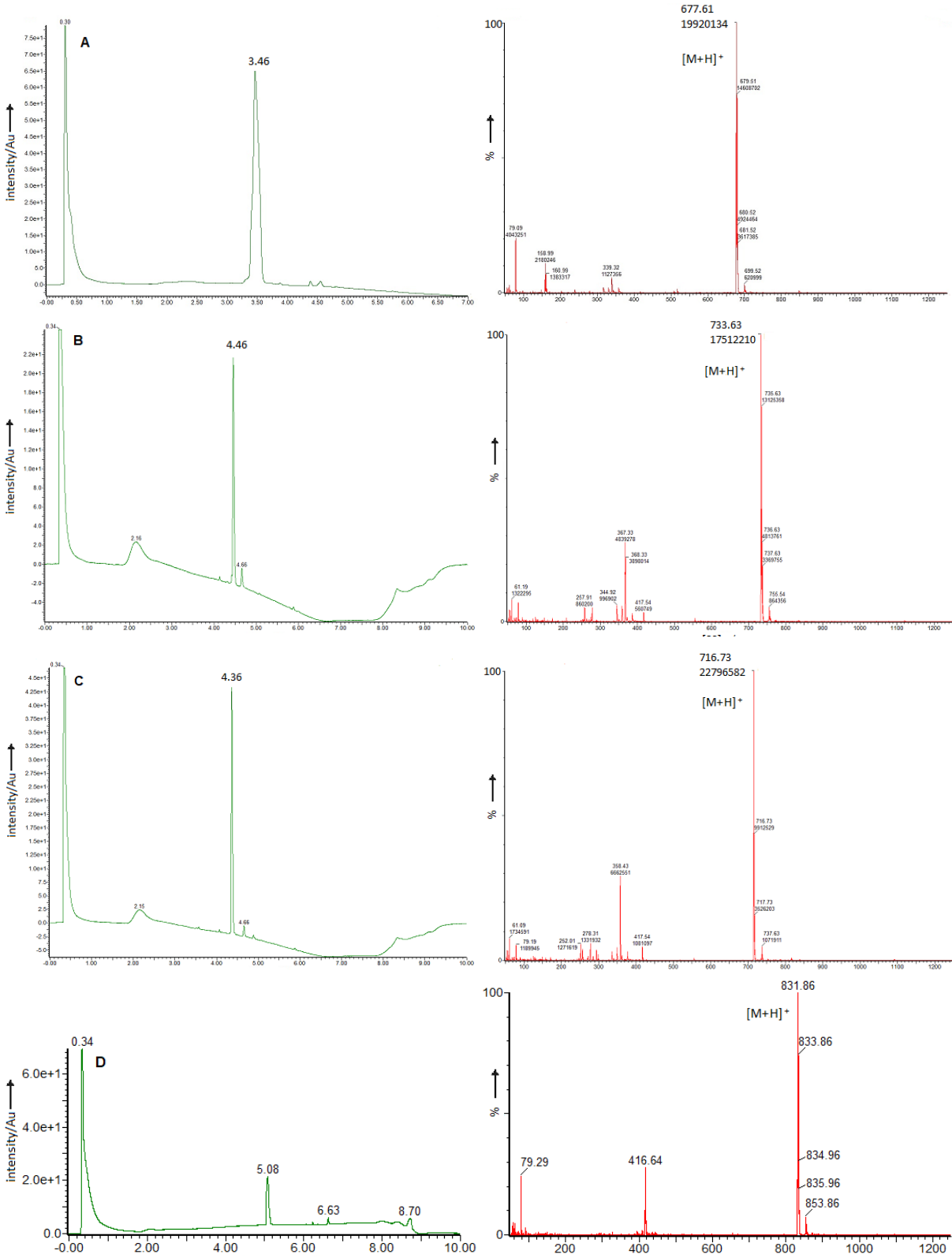


Abbildung S 153: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-11 [B] S2i-12 [C] S2i-13 und [D] S2i-14

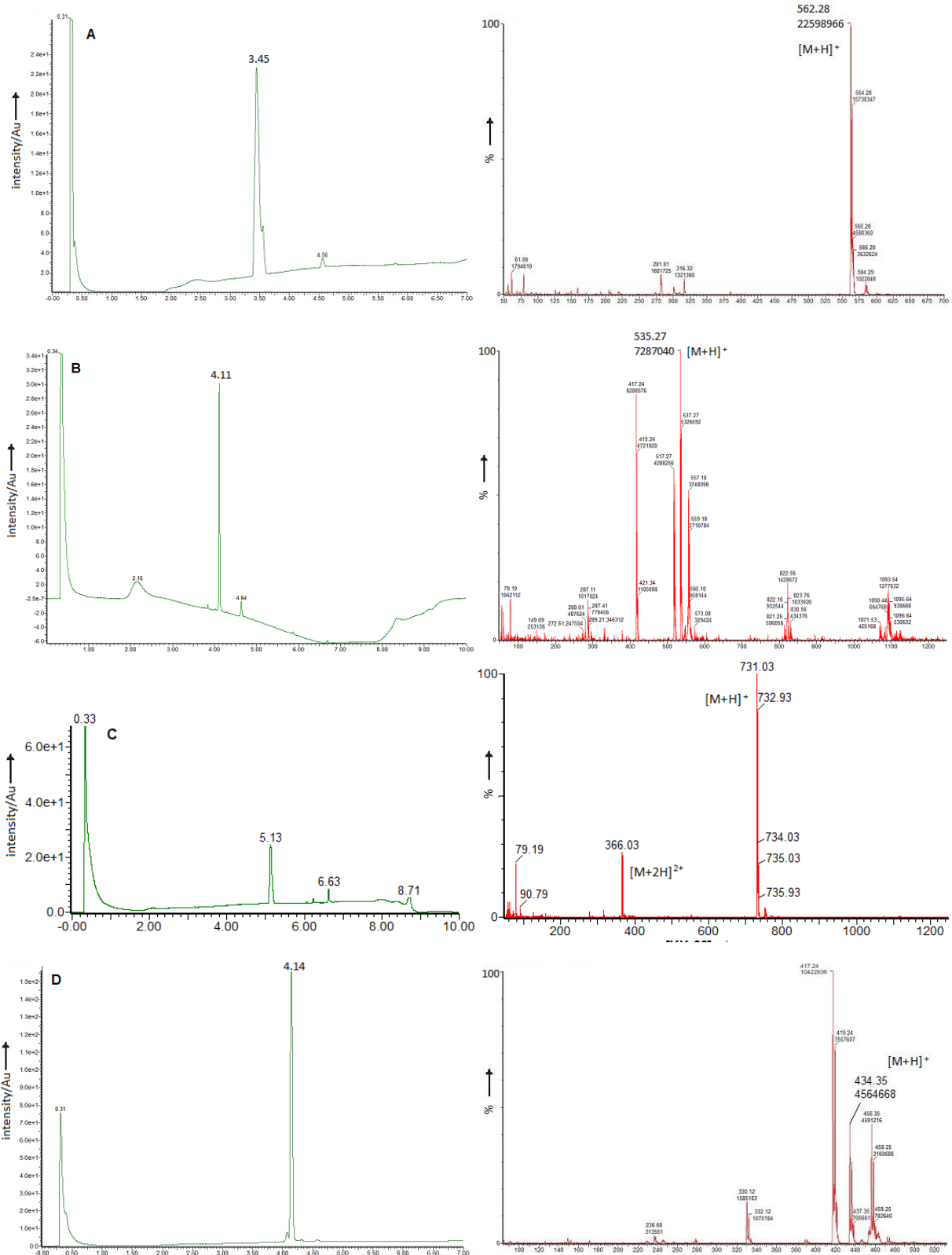


Abbildung S 154: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-KK-1 [B] S2i-KT-1 [C] S2i-KK-14 und [D] S2i-K-1

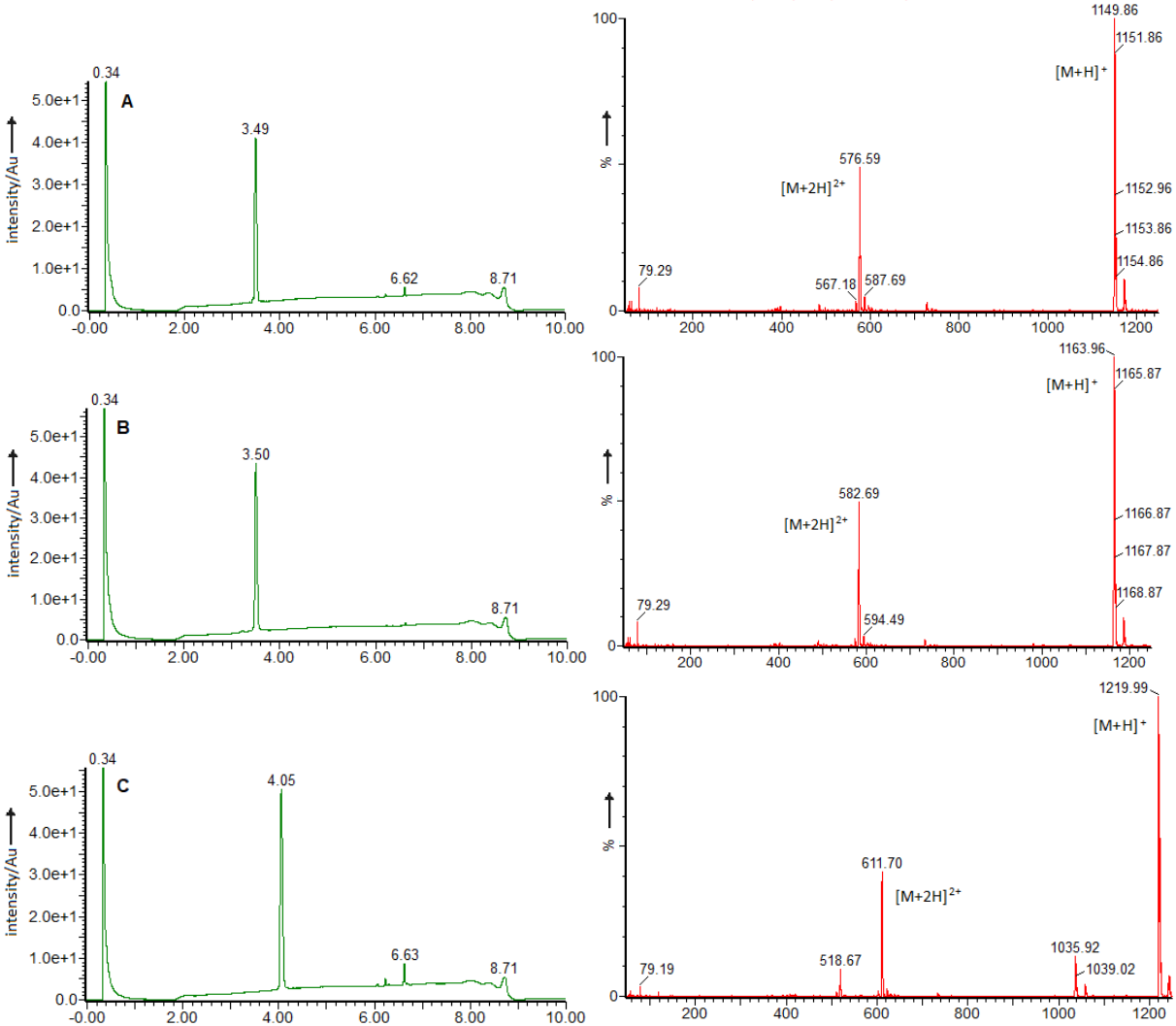


Abbildung S 155: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-BT-1 [B] S2i-BT-11 und [C] S2i-BT-12

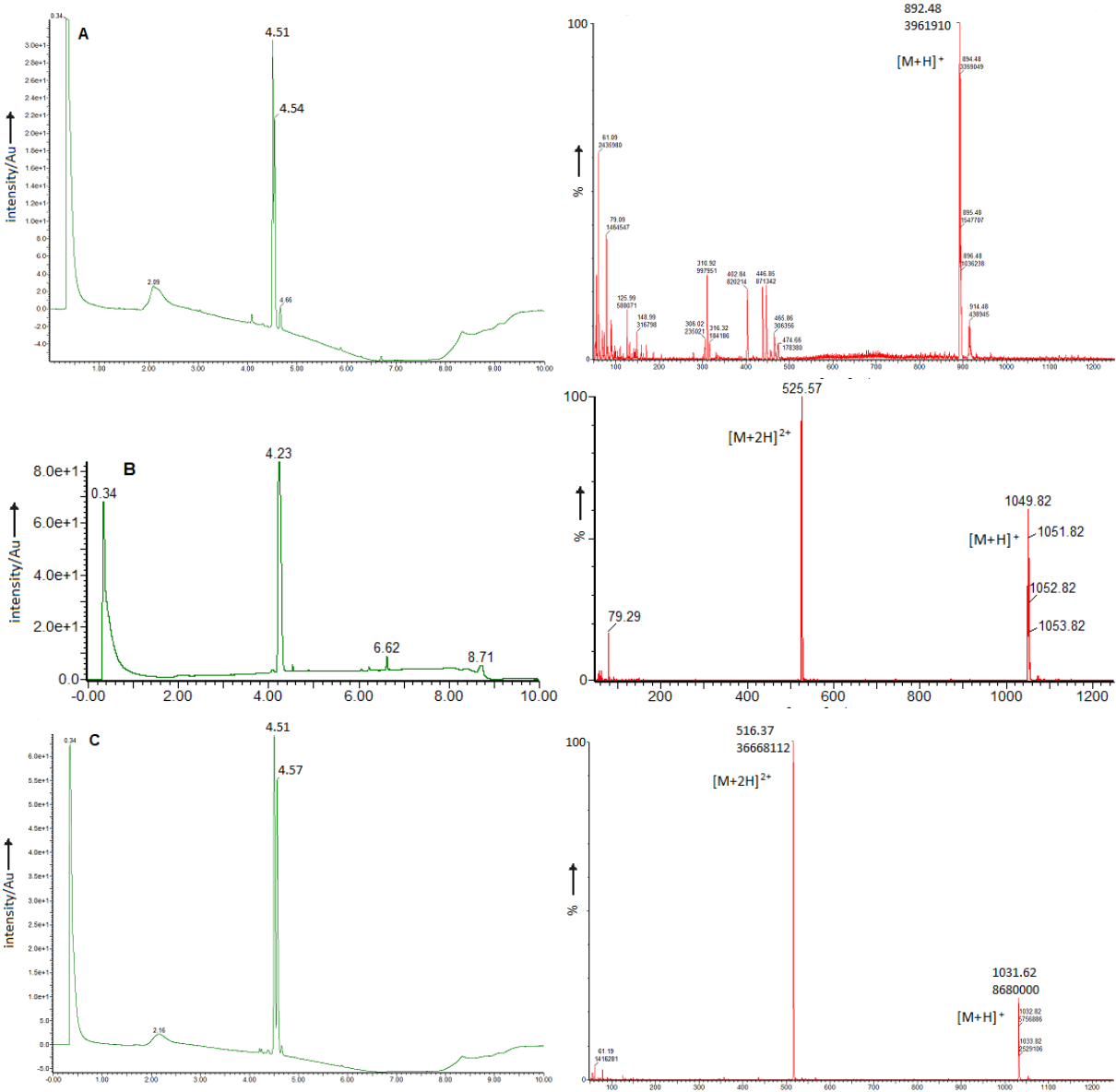


Abbildung S 156: UPLC-MS der Inhibitoren [A] S2i-FL-1 [B] S2i-FL-12 und [C] S2i-FL-13

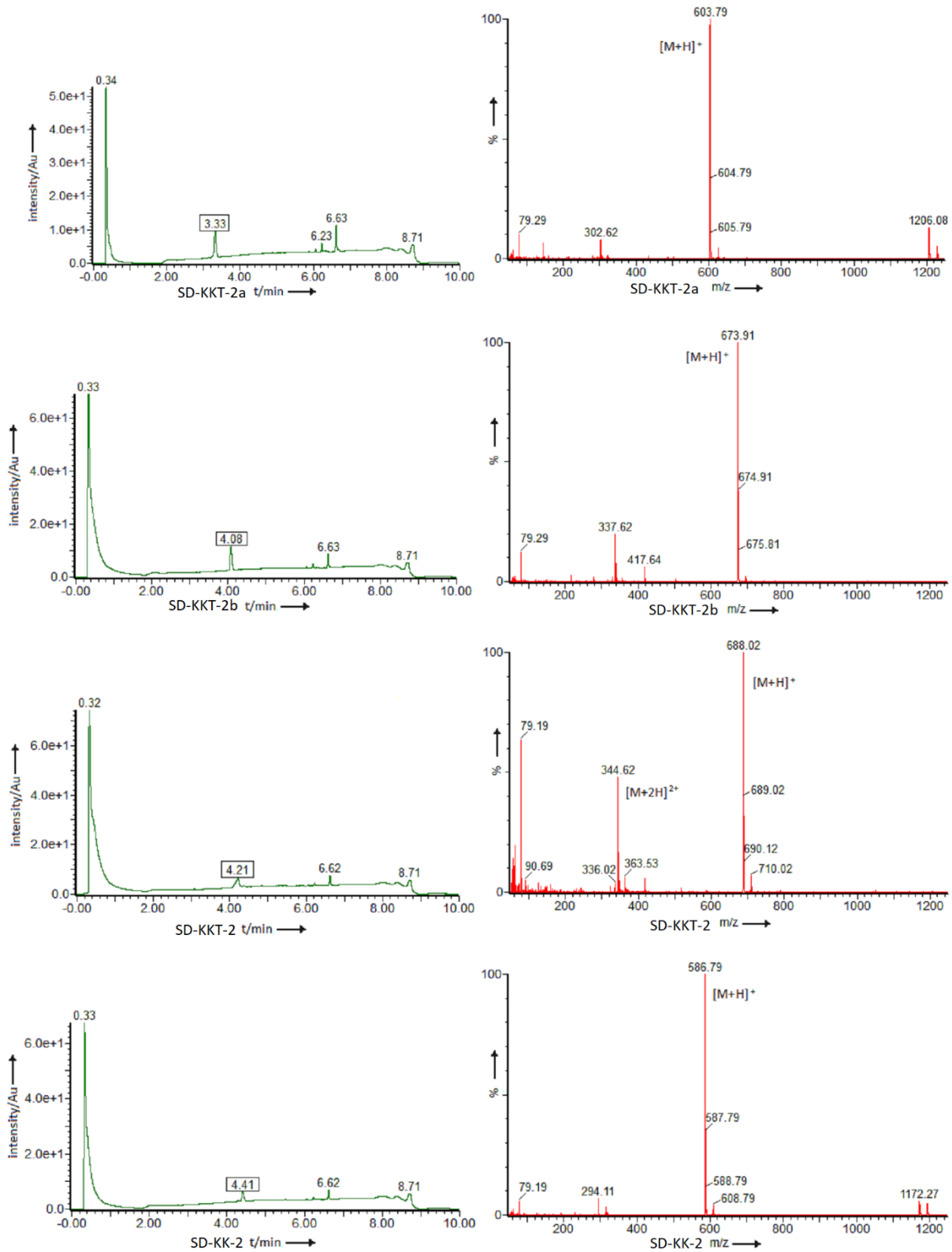


Abbildung S 157: UPLC-MS der Inhibitoren [A] SD-KKT-2a [B] SD-KKT-2b [C] SD-KKT-2 [D] und SD-KK-2

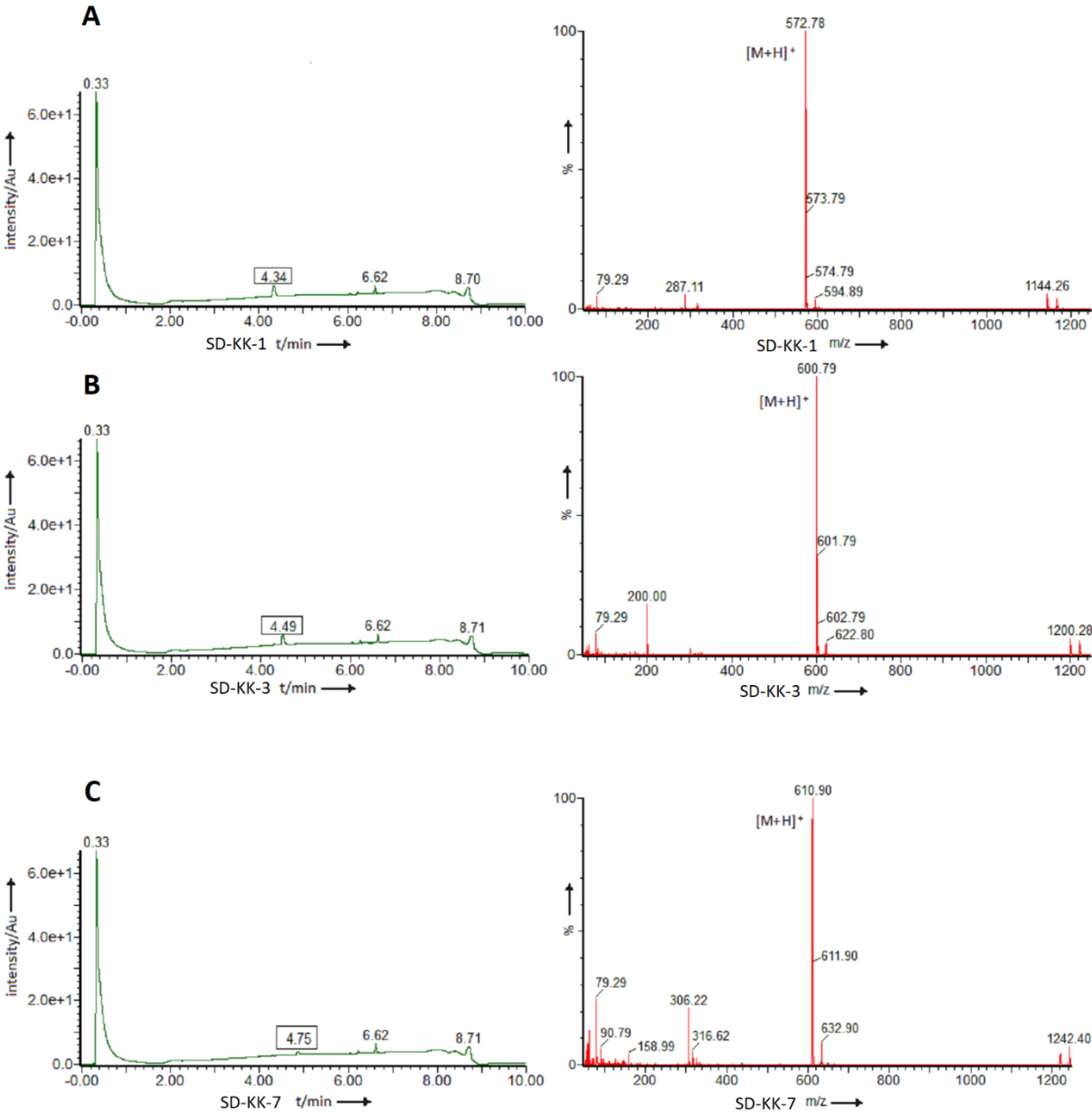


Abbildung S 158: UPLC-MS der Inhibitoren [A] SD-KK-1a [B] SD-KK-3 und [C] SD-KK-7

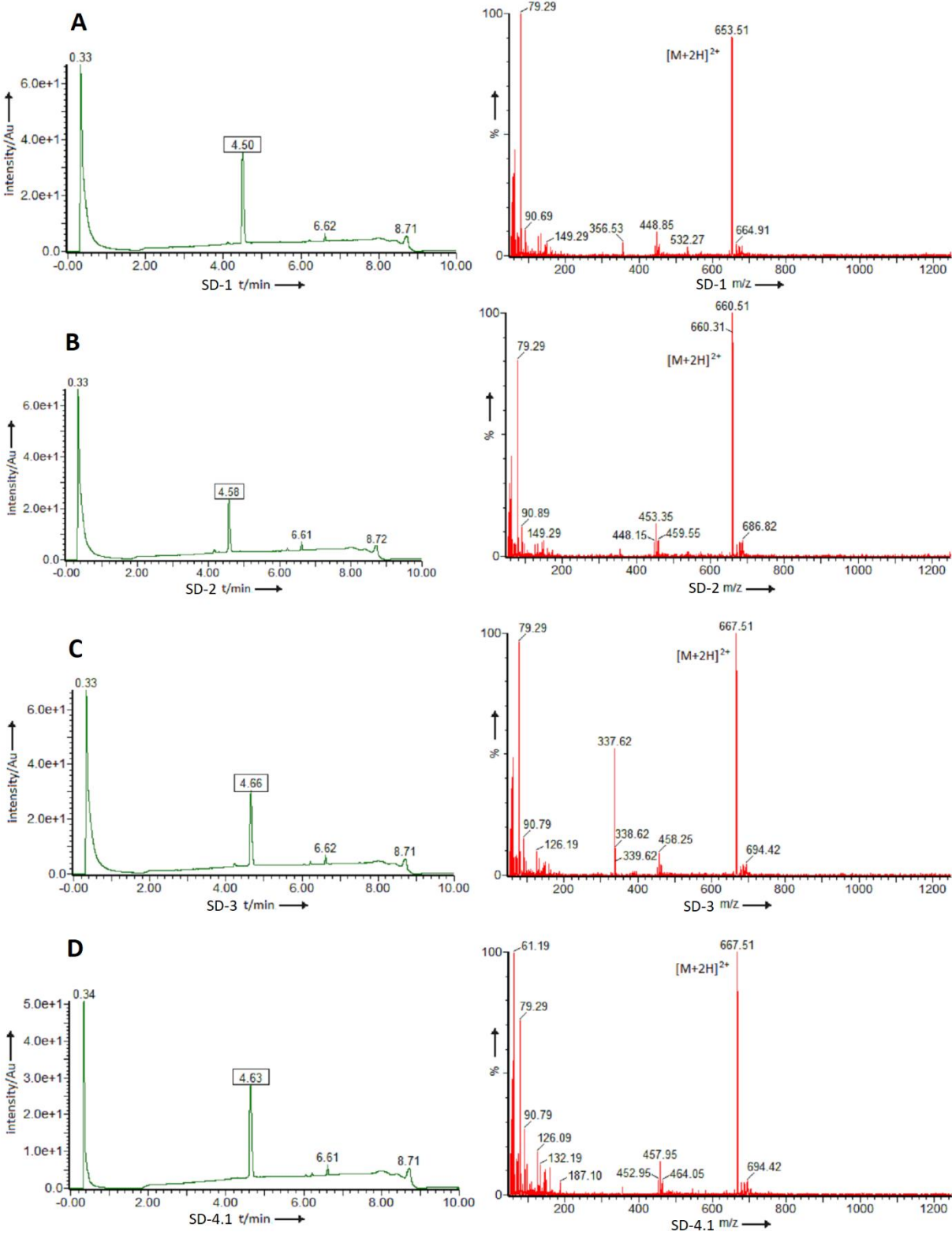


Abbildung S 159 : UPLC-MS der Inhibitoren [A] SD-1 [B] SD-2 [C] SD-3 und [D] SD-4.1

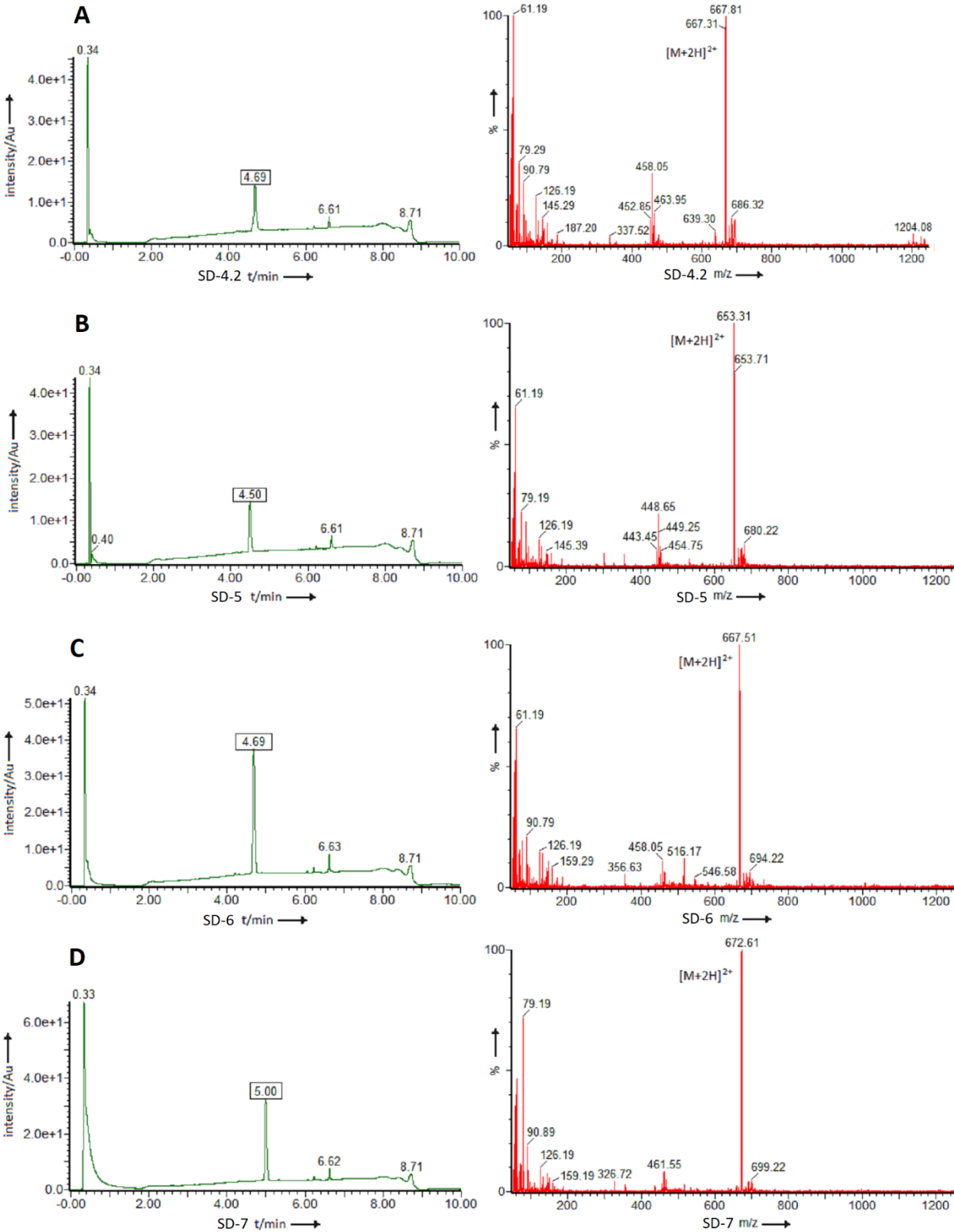


Abbildung S 160: UPLC-MS der Inhibitoren [A] SD-4.2 [B] SD-5 [C] SD-6 und [D] SD-7

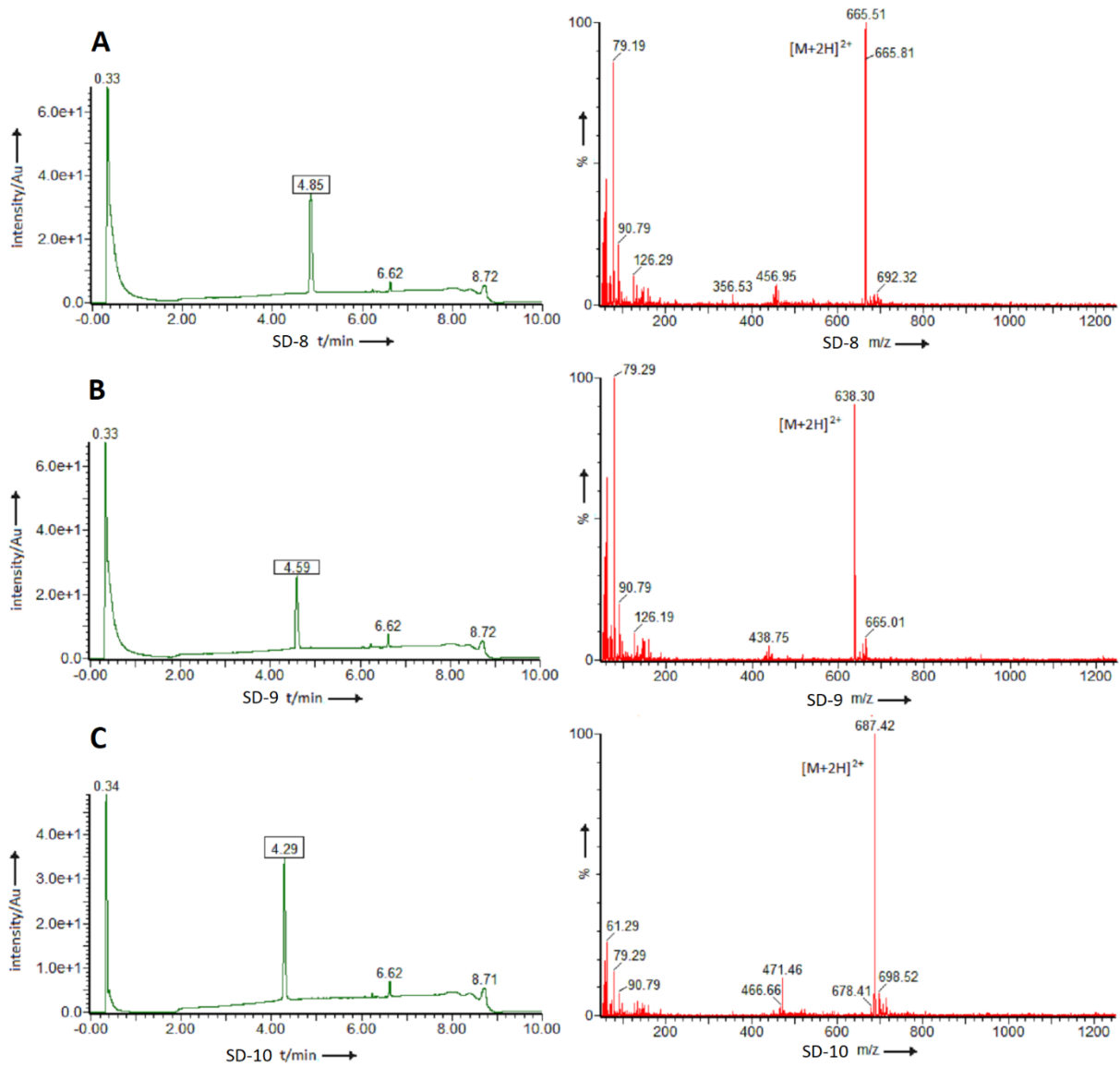


Abbildung S 161 : UPLC-MS der Inhibitoren [A] SD-8 [B] SD-9 und [C] SD-10

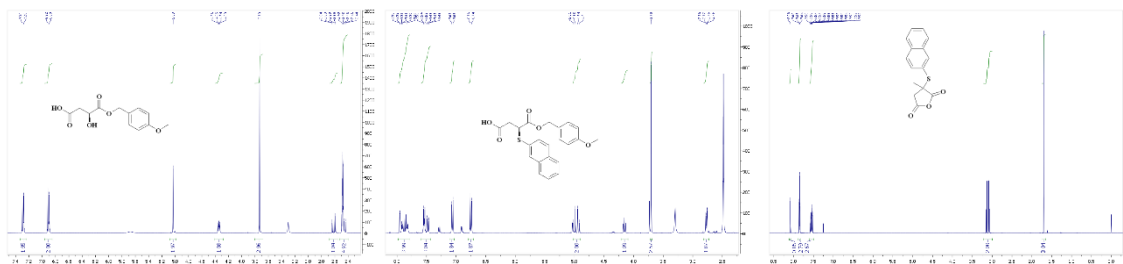


Abbildung S 162: [Links] NMR-spektrum von (S)-2-hydroxysuccinylsäure 1-(4-methoxybenzyl) ester [Mitte] NMR-spektrum von (S)-2-(2-naphthylmercapto)succinylsäure 1-(4-methoxybenzyl) ester, [Rechts] NMR-spektrum von 2-methyl-2-(2-naphthylmercapto)succinyl anhydrid

Publikationsliste

1. Potent and Selective Inhibitors of Human Sirtuin 5

Diana Kalbas, Sandra Liebscher, Theresa Nowak, Marat Meleshin, Martin Pannek, Corinna Popp, Zayan Alhalabi, Frank Bordusa, Wolfgang Sippl, Clemens Steegborn, Mike Schutkowski

J Med Chem, 2018 Mar 22;61(6):2460-2471. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01648. Epub 2018 Mar 12.

PMID: [29494161](#)

2. One-Atom Substitution Enables Direct and Continuous Monitoring of Histone Deacetylase Activity

Matthes Zessin, Zsófia Kutil, Marat Meleshin, Zora Nováková, Ehab Ghazy, **Diana Kalbas**, Martin Marek, Christophe Romier, Wolfgang Sippl, Cyril Bařinka, Mike Schutkowski

Biochemistry, 2019 Dec 3;58(48):4777-4789. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00786. Epub 2019 Nov 14.

PMID: [31682411](#)

3. Continuous Sirtuin/HDAC (histone deacetylase) activity assay using thioamides as PET (Photoinduced Electron Transfer)-based fluorescence quencher

Matthes Zessin, Marat Meleshin, Zeljko Simic, **Diana Kalbas**, Miriam Arbach, Philip Gebhardt, Jelena Melesina, Sandra Liebscher, Frank Bordusa, Wolfgang Sippl, Cyril Barinka, Mike Schutkowski

Bioorg Chem, 2021 Dec;117:105425. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105425. Epub 2021 Oct 12.

PMID: [34695733](#)

4. Small Changes Make the Difference for SIRT2: Two Different Binding Modes for 3-Arylmercapto-Acylated Lysine Derivatives

Diana Kalbas, Marat Meleshin, Sandra Liebscher, Matthes Zessin, Jelena Melesina, Cordelia Schiene-Fischer, Emre Fatih Bülbul, Frank Bordusa, Wolfgang Sippl, Mike Schutkowski

Biochemistry, 2022 Sep 6;61(17):1705-1722. doi: 10.1021/acs.biochem.2c00211. Epub 2022 Aug 16.

PMID: [35972884](#)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diana Kalbas

Akademische Laufbahn

Januar 2017 – Aktuell

Promotion Biochemie

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thema der Doktorarbeit: Design, Synthese und Charakterisierung neuer SIRTUIN Inhibitoren

Oktober 2015 – Dezember 2016

Master Biochemie

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschluss: *Master of Science*

Thema der Masterarbeit: Design und Synthese neuer SIRTUIN 5 Inhibitoren

Oktober 2010 – September 2014

Bachelor Biochemie

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschluss: *Bachelor of Science*

Thema der Bachelorarbeit: Etablierung eines nicht-radioaktiven Nachweises für tRNA-Modifizierungsreaktionen

Ausbildung

Oktober 2007 – September 2010

Abschluss: Medizinisch-technische Laboratoriumsassistenten

Medizinische Schule an der Carl-Thiem-Klinikum gGmbH, Schule für medizinisch-technische Assistenz in Cottbus

Schulbildung

Oktober 2006 – September 2007

Abitur, Leon-Foucault-Gymnasium Hoyerswerda

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden und, dass die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind. Des Weiteren erkläre ich, dass diese Arbeit an keiner weiteren Einrichtung eingereicht wurde und dies mein erster Promotionsversuch ist. Ebenfalls versichere ich, dass keine Vorstrafen vorliegen und keine laufenden Verfahren gegen mich laufen.

Halle (Saale) den _____

Diana Kalbas

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlichst bei allen Menschen bedanken, die mich auf meiner Reise begleitet haben.

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Mike Schutkowski danken, der mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und meine Ergebnisse z.T. in Form von Publikationen zu veröffentlichen.

Außerdem Danke Ich Dr. Marat Meleshin für die Synthese vieler Peptid-Derivate und Ilona Kunze für deren Reinigung, damit ich meinen Fokus voll auf die Enzymkinetik legen konnte

Weiterhin Danke ich Dr. Sandra Liebscher aus der AG Naturstoffbiochemie für die Durchführung aller biologischen Experimente.

Ich danke auch PD. Dr. Cordelia Schiene-Fischer mit der ich gemeinsam jedes Bachelor- und Masterpraktikum überstanden habe, so schwer die Bedingungen in den letzten Jahren auch waren. Außerdem stand Sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite zur (weiter)Entwicklung der Experimente.

Ich danke auch Matthes Zessin für die gemeinsamen 6 Jahre, als Leidgenossen in einem Büro. Gemeinsam haben wir uns unterstützt und gegenseitig aufgebaut, um bis zum Schluss durchzuhalten.

Ich bedanke mich auch bei Aristoteles und Platon, die mir, neben meiner eigentlichen Arbeit, noch einen Grundkurs in HPLC-Anlagen-Aufbau gaben, indem ich jedes einzelne ihre Module eigenhändig reparieren durfte.

Danke an alle Mitglieder der AG Enzymologie, auch an die die gegangen sind.

Ich bedanke mich auch bei Falko Jähnert, Dr. Andreas Simon, René Wartner und Dr. Lars Franke für die vielen entspannten Kaffeepausen und regen Austausch von wissenschaftlicher und nichtwissenschaftlicher Seite, die mir jedes Mal neue Energie zum Weitermachen gaben.

Im Privaten möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich die ganzen Jahre, von Bachelor- über Master- bis hin zur Doktorarbeit mit allen, was Sie hatten, unterstützt haben. Ohne Sie wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Dann bedanke ich mich auch bei meinem Partner (mittlerweile Ehemann) der mich ebenfalls seit dem Bachelor begleitet und alle Höhen und Tiefen miterlebte – und mich dennoch heiratete~

Schlussendlich möchte ich diese Arbeit den Leuten widmen, die das Ende meiner Reise leider nicht mehr erleben können – meinen Großeltern. Insbesondere meinem Großvater Hans Kalbas, der, trotz fachfremden Gebietes, sich immer für meinen Fortschritt und Arbeit interessierte und genauso neugierig war, wie ich es heute immer noch bin. - Danke