

Kinetische Untersuchungen humaner Sirtuin-Isoformen

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biochem. Claudia Rößler

geb. am 03.06.1987 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Mike Schutkowski
Prof. Dr. Wolfgang Sippl
Prof. Dr. Dirk Schwarzer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.07.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vi
Teil 1. NAD ⁺ -abhängige Protein-Lysin-Deacylasen - Sirtuine.....	1
Teil 2. Substrate und Funktionen humaner Sirtuine	4
2.1. Die nuklearen Sirtuine.....	4
2.2. Das zytosolische Sirtuin	4
2.3. Die Sirtuine des Mitochondriums.....	5
2.4. Acylspezifität des humanen Sirtuin 5.....	5
Artikelkopie „Chemische Untersuchung des aktiven Zentrums des humanen Sirtuin 5 offenbart dessen Acylspezifität und Peptid-basierte Inhibitoren“.....	7
Teil 3. Effektoren der Sirtuin-Aktivität.....	13
3.1. Sirtuin 2 spezifische Inhibitoren.....	17
Artikelkopie „Selektive Sirt2 Inhibition durch Liganden-induzierte Umlagerung des aktiven Zentrums“.....	18
Teil 4. Bestimmung der Sirtuin-Aktivität	19
4.1. Assay-Systeme	19
Artikelkopie „Neue Assays und Anwendungen zur Entwicklung von Sirtuin Effektoren“ ..	19
4.2. Fluoreszenz-basierte Sirtuin-Assays	20
4.2.1. Protease-gekoppelte Assays	20
Manuskriptkopie „Ein neuer kontinuierlicher Assay für die Deacylase Sirt5 und anderer Deacetylasen“	21
4.2.2. Kontinuierliche direkte Assays.....	26
Manuskriptkopie „Der erste direkte und kontinuierliche Sirtuin Assay“	27
Teil 5. Diskussion	37
Zusammenfassung.....	41
Literaturverzeichnis	43
Anhang.....	a

Publikationsliste und Nachweis des Eigenanteils.....	c
Selbstständigkeits- und Einmaligkeitserklärung	d
Lebenslauf.....	e
Danksagung	f

Abkürzungsverzeichnis

Abz	2-Aminobenzoyl
ADP	Adenosindiphosphat
AGK2	2-Cyano-3-[5-(2,5-dichlorophenyl)-2-furyl]-N-5-quinolinylacrylamide
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>
AS	Aminosäure
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BubR1	<i>budding uninhibited by benzimidazole-related 1</i>
Bz	Benzoyl
CoA	Coenzym A
CPS1	Carbamoylphosphat Synthetase 1
FdL	Fluor-de-Lys [®]
FOXO	<i>forkhead box O</i>
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GDH	Glutamatdehydrogenase
H 1-4	Histon H 1-4
H1299	<i>human non-small cell lung carcinoma cell line 1299</i>
HDAC	Histondeacetylase
HIF-1 α	Hypoxie-induzierender Faktor 1 α
Hst	<i>homologues of sir two</i>
IC ₅₀	halbe inhibitorische Konzentration
k _{cat}	Wechselzahl
k _{cat} /K _M	katalytische Effizienz
K _i	Inhibitorkonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
K-RAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Mca	(7-Methoxycoumar-4-yl)-essigsäure
MCF-1	Michigan Cancer Foundation 1
MEF-1	embryonale Maus-Fibroblasten 1
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1 complex
MS	Massenspektrometrie
mtHsp60	mitochondriales Hitzeschockprotein 60
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid

NAM	Nikotinamid
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
pdb	Proteindatenbank
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PTM	posttranslationale Modifikation
RaPID	<i>random nonstandard peptide integrated discovery</i>
Sir2	<i>silent information regulator 2</i>
SirReal2	<i>sirtuin rearranging ligand 2</i>
Sirt	Sirtuin
TAc	Thioacetyl
TAMRA	Tetramethylrhodamin-6-carbonsäure
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TMyr	Thiomyristoyl
TSucc	Thiosuccinyl
Tub	α -Tubulin
Y(NO ₂)	3-Nitrotyrosin
zSirt5	Sirtuin 5 aus Zebrafisch

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

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Sirtuin-Proteinstruktur am Beispiel des humanen Sirtuin 5.	2
Abbildung 2. Sirtuin Reaktionsmechanismus.	3
Abbildung 3. (A) Aktives Zentrum von Sirt5 (pdb-Datei 3RIY). (B) Kinetische Effizienzen (k_{cat}/K_M) verschiedener CPS1-Derivate.	6
Abbildung 4. Ausbildung des S-Alkylimidat-Intermediates.	14
Abbildung 5. Chemische Strukturen verschiedener Sirtuin-Effektoren.	15
Abbildung 6. NAM und Ex-527 binden in der C-Tasche von Sirtuinen.	16

Teil 1. NAD⁺-abhängige Protein-Lysin-Deacylasen - Sirtuine

Zelluläre Prozesse unterliegen einer Vielzahl von Regulationsmechanismen, bei denen posttranslationale Modifikationen (PTM) von Proteinen eine zentrale Rolle spielen.² Zu den häufigsten Proteinmodifizierungen gehören die Glykosylierung der Seitenketten-Funktion von Asparagin, Serin oder Threonin,³ die Phosphorylierung der Hydroxyl-Gruppe von Serin, Threonin oder Tyrosin,⁴ die Methylierung der Lysin- und Arginin-Seitenkette beziehungsweise die Acylierung der ε-Aminofunktion von Lysin.⁵ Erstmals wurde die Acetylierung der ε-Aminogruppe von Lysinen an Histonen beschrieben.^{5a} Aktuelle Studien zeigen, dass im humanen Proteom mehr als 6800 Acetylierungsstellen existieren.⁶ Neben der Lysin-Acetylierung wurden in den letzten Jahren auch andere Acylierung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Dazu gehören unter anderem Malonylierung,⁷ Succinylierung,^{7a} Glutarylierung,⁸ Myristoylierung,⁹ Propionylierung,¹⁰ Butyrylierung,^{10a} Crotonylierung¹¹ und 3-Phosphoglycerilylierung.¹² Während bekannt ist, dass der Acetylierungsgrad der Zelle durch Lysin-Acetyltransferasen (22 im humanen Proteom) und deren Antagonisten Lysin-Deacetylasen (18 im humanen Proteom) reguliert wird,¹³ ist vor allem der Transfer anderer Acylierungen nicht vollständig aufgeklärt. Neuste Publikationen zeigen, dass der Acyltransfer im Mitochondrium wahrscheinlich spontan mit Hilfe von Acyl-Coenzym A oder Acylphosphaten erfolgen kann.¹⁴ Die Abspaltung der oben genannten PTMs erfolgt durch eine Untergruppe der Lysin-Deacetylasen, den NAD⁺-abhängigen Sirtuinen (Sirt).

Die nach dem Hefeprotein Sir2 benannten Sirtuine (*Sir2 like proteins*) kommen in einer Vielzahl von Organismen, von Bakterien bis Säugetieren, vor.¹⁵ Die Anzahl der Sirtuin-Isoformen variiert innerhalb des jeweiligen Organismus, wobei im Menschen sieben Sirtuine existieren.¹⁶ Alle Isoformen bestehen aus einer konservierten Kerndomäne (~275 Aminosäuren) und individueller N- und C-terminaler Sequenzen.¹⁷ Aufgrund ihrer Strukturunterschiede und ihrer Substrateigenschaften lassen sich die Sirtuine in 4 Klassen unterteilen.¹⁵ Zur Klasse I gehören Sirtuine, welche strukturell die höchste Ähnlichkeit zu Hefe-Sir2 aufweisen. Dies schließt beispielsweise Hst1 und Hst2 (*homologues of sir two*) aus *S. cerevisiae*, humanes Sirtuin 1, Sirtuin 2 und Sirtuin 3 und andere Sirtuine aus Pilzen und Protozoen ein. Alle weisen Deacetylase-Aktivität auf. Humanes Sirtuin 4 wird, neben Sirtuinen aus Bakterien, Insekten und Nematoden, der Klasse II zugeordnet. Für Sirtuin 4 konnte bisher nur eine geringe Deacetylase-Aktivität nachgewiesen werden,¹⁸ wohingegen dieses Sirtuin auch die ADP-Ribosylierung von Glutamat-Dehydrogenase (GDH) katalysiert.¹⁹ Zur Klasse III gehört Sirt5, welches als Einziges in der Lage ist, neben Acetyl, auch die Spaltung von Dicarbonsäureamid, wie Malonsäureamid, Bernsteinsäureamid oder Glutarsäureamid, zu katalysieren.²⁰ Sirtuine der Klasse IV kommen nicht in Prokaryoten vor, sind aber in Metazoen, Pflanzen und Vertebraten weit verbreitet. Zu dieser Klasse gehören auch die huma-

nen Sirtuine 6 und 7, welche beide eine geringe Deacetylase-Aktivität besitzen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Sirt 6 langkettige Fettsäurereste, wie Myristoyl, bevorzugt.²¹ Die Spaltung langkettiger Fettsäureamide ist nicht nur auf Sirt6 beschränkt, sondern wird auch von Sirt1 – Sirt5 katalysiert.²¹

Die bei allen Sirtuinen konservierte Kerndomäne lässt sich strukturell in zwei Untereinheiten unterteilen (Abb. 1). Den größeren Teil nimmt die Rossmann-Spalte ein, welche in allen NAD(H) bindenden Proteinen konserviert ist. Der kleinere Teil wird als Zink-Bindedomäne bezeichnet. Diese zeichnet sich durch 4 konservierte Cysteine aus, welche ein Zn^{2+} -Ion komplexieren. Das gebundene Zn^{2+} -Ion ist bei Sirtuinen, im Gegensatz zu anderen Lysin-Deacetylasen (HDAC), nicht an der Katalyse beteiligt, sondern stabilisiert lediglich dessen Struktur. Beide Domänen sind über eine hydrophobe *Loop*-Region miteinander verbunden, in welcher sich das katalytische Zentrum befindet.²² Zunächst wird das acylierte Peptid- bzw. Proteinsubstrat gebunden, gefolgt von der Bindung des Kosubstrates NAD^+ . Die Bindung des NAD^+ kann nur durch eine Konformationsänderung der Zink-Bindedomäne erfolgen, welche durch die Bindung des Peptids / Proteins ausgelöst wird. Anschließend kommt es zu einer Konformationsänderung des *cofactor binding loops*, welcher beide Substrate im katalytischen Zentrum fixiert.²³

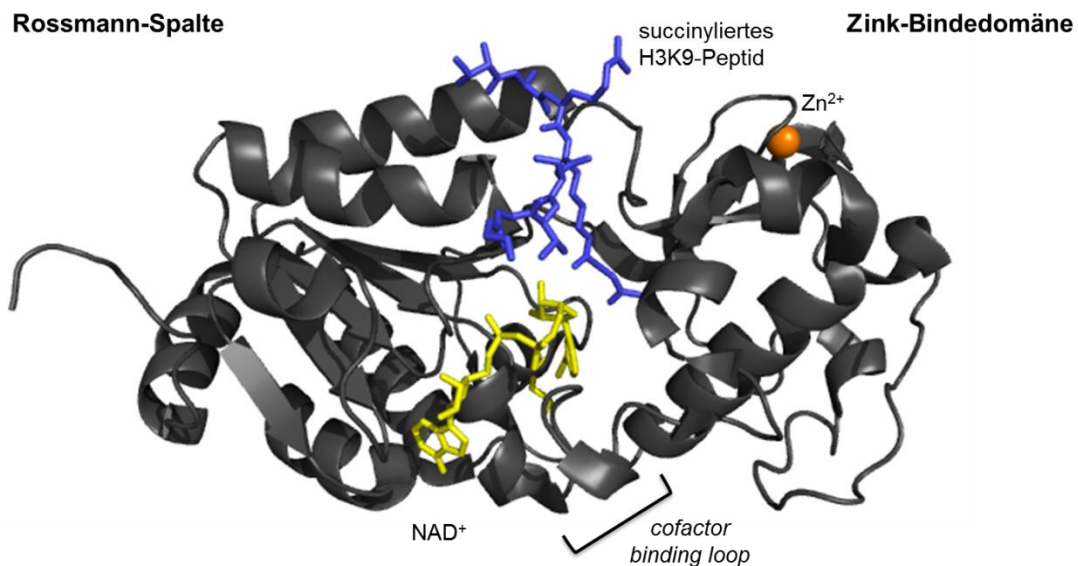


Abbildung 1. Sirtuin-Proteinstruktur am Beispiel des humanen Sirtuin 5. Die Struktur wurde der pdb-Datei 3RIY entnommen. Zwischen der Zink-Bindedomäne und der Rossmann-Spalte befindet sich das aktive Zentrum, wo acyliertes Peptid (blau) und NAD^+ (gelb) gebunden werden. Die Proteinkristallstruktur ist im Cartoon-Stil in grau und das gebundene Zn^{2+} -Ion als Kugel in orange dargestellt.

Nach der Bindung beider Substrate im aktiven Zentrum wird die Acyl-Modifikation der Lysin ϵ -Aminogruppe mit Hilfe von NAD^+ zu deacyliertem Lysin, Nikotinamid und 2'-O-Acyl-ADP-Ribose umgesetzt. Zunächst greift der Acyl-Sauerstoff das C1'-Atom der NAD^+ -Ribose nukleophil an. Nikotinamid wird abgespalten und ein Alkylimidat-Intermediat ausgebildet. Die aktivierte 2'-OH-Gruppe der Ribose greift dieses Intermediat nukleophil an und es bildet sich ein 1', 2'-bicyklisches Intermediat. Während das deacylierte Peptid bzw. Protein abgespalten wird, setzt ein aktiviertes Wassermolekül das vorliegende Intermediat in ein weiteres bicyklisches Intermediat um, welches anschließend als 2'-O-Acyl-ADP-Ribose freigesetzt wird (Abb. 2).²⁴ Die 2'-O-Acyl-ADP-Ribose liegt in Lösung im Gleichgewicht mit seinem 3'-O-Acyl-Isomer vor.²⁵

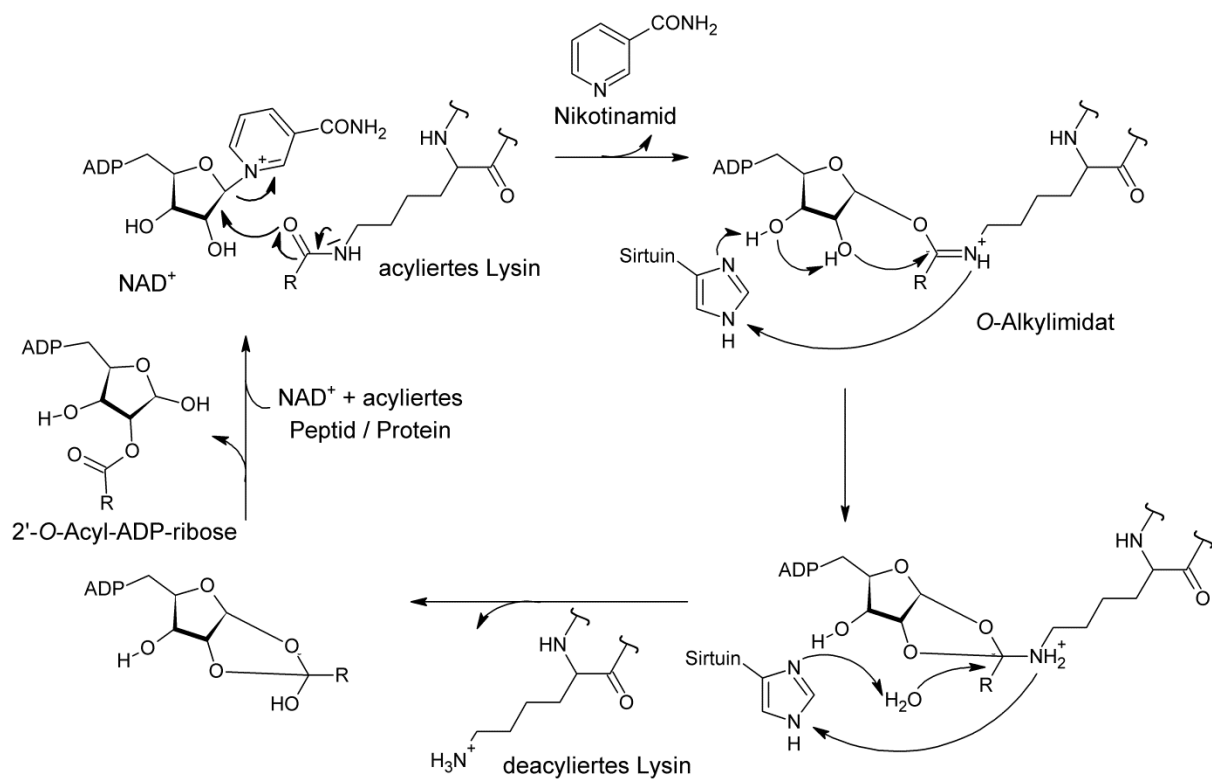


Abbildung 2. Sirtuin Reaktionsmechanismus. Die Acyl-Modifikation wird NAD^+ -abhängig von der ϵ -Aminogruppe des Lysins abgespalten. Dabei entstehen Nikotinamid, deacyliertes Lysin und 2'-O-Acyl-ADP-ribose. $-\text{R} = -\text{CH}_3$ entspricht der Deacetylase-Aktivität, $-\text{R} = -\text{CH}_2-\text{COOH}$ der Demalonylase-Aktivität, $-\text{R} = -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ der Desuccinylase-Aktivität und $-\text{R} = -(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3$ der Demyristoylase-Aktivität von Sirtuinen.

Teil 2. Substrate und Funktionen humaner Sirtuine

2.1. Die nuklearen Sirtuine

Von den sieben humanen Sirtuin-Isoformen sind Sirt1, Sirt6 und Sirt7 im Zellkern lokalisiert.²⁶ Sirt1 ist in der Lage sich zwischen Zellkern und Zytosol hin- und her zu bewegen.²⁷ Der Mechanismus des Kerntransports, sowie der Auslöser für die Translokation, sind bisher noch unbekannt. Sirt1 wurde zunächst nur als Histondeacetylase beschrieben, welches beispielsweise Histon H1 (K9, 26), H3 (K14) und H4 (K16) deacetyliert.²⁸ Als erstes Nicht-Histon-Substrat wurde der Tumorsuppressor p53 beschrieben, aber auch eine Vielzahl anderer Proteine konnten als Substrate für Sirt1 nachgewiesen werden. Unter denen befinden sich hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, wie p10, *forkhead box O* (FOXO) Proteine und nuklearer Faktor κ B (NF- κ B), sowie DNA Reparatur-Proteine, wie Ku-70 oder MRN.²⁹ Aufgrund der hohen Anzahl an Zielproteinen und der Expression in vielen Organen und Geweben (Bsp. Leber, Pankreas, Gehirn, Muskulatur) beeinflusst Sirt1 unterschiedlichste zelluläre Prozesse. Dazu gehören der Lipid- und Glucose-Stoffwechsel, oxidativer Stress, die Insulinaufnahme, die Expression mitochondrialer Gene und die Fettsäureoxidation.³⁰ Ein Antagonist der Regulation der Insulinaufnahme ist Sirt6. Während Sirt1 für eine verstärkte Aufnahme von Insulin in der Muskulatur sorgt, inhibiert Sirt6 diese,³¹ in dem es durch die Deacetylierung von Lysin 9 des Histons H3 den Fettsäureabbau aktiviert und sowohl die Glykolyse als auch die Lipogenese inhibiert.³²

Im Gegensatz zu Sirt1 besitzt Sirt7 eine sehr geringe Deacetylase-Aktivität. Aufgrund dessen ist sehr wenig über dessen Zielproteine bekannt. Zum einen reguliert Sirt7 die Apoptose durch Deacetylierung von p53,³³ zum anderen aktiviert es die Transkription durch die Regulierung der Aktivität der RNA Polymerase I und die Deacetylierung von Histon H3 (K18).³⁴ Der Hypoxie-induzierende Faktor 1 α (HIF-1 α) wird durch die Interaktion mit Sirt7 inhibiert.³⁵

2.2. Das zytosolische Sirtuin

Sirt2 ist das einzig bekannte Sirtuin, welches größtenteils im Zytosol zu finden ist. Es kann jedoch während des Zellzyklus zwischen G2- und M-Phase in den Zellkern wandern.³⁶ Sirt2 besitzt, wie Sirt1, eine hohe Deacetylase-Aktivität. Eines der Sirt2-Substratproteine ist α -Tubulin.³⁷ Sirt2 hat Einfluss auf viele metabolische Prozesse, unter anderem durch die Regulierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, welche an der Gluconeogenese beteiligt ist.³⁸ Die Aktivierung von FOXO 1 durch Sirt2 führt zu einer Verringerung der Differenzierung von Adipozyten.³⁹

2.3. Die Sirtuine des Mitochondriums

Im Mitochondrium sind Sirt3, Sirt4 und Sirt5 lokalisiert.²⁶ Von diesen drei Isoformen besitzt Sirt3 die höchste Deacetylase-Aktivität.⁴⁰ Für das humane Sirt4 war lange Zeit nur bekannt, dass es ADP-Ribose auf Arginin-, Glutamat- oder Aspartat-Seitenketten übertragen kann.⁴¹ Erst die Untersuchung aller humaner Acetylierungsstellen auf Mikroarrays offenbarte potentielle Substratproteine für Sirt4, zu denen mtHsp60 (mitochondriales Hitzeschockprotein) und NAD(P)-Transhydrogenase gehören.¹⁸ Vor kurzem wurde nachgewiesen, dass Sirt4 in der Lage ist Liponsäureamide zu spalten und damit die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDH) zu regulieren.⁴²

Die mitochondrialen Sirtuine haben Einfluss auf viele metabolische Prozesse. Beispielsweise reguliert Sirt3, während längerer Phasen des Fastens, die Aktivität der Fettsäure-CoA-Dehydrogenase, welches zum erhöhten Abbau von Fettsäuren führt.⁴³ Zudem kommt es durch die von Sirt3 katalysierte Deacetylierung der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase 2 zur vermehrten Bildung von Keton-Körpern, welche bei Glucosemangel eine wichtige Energiequelle des Gehirns darstellen.⁴⁴ Außerdem aktiviert Sirt3 den Zitrat-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung durch Deacetylierung der Isocitrat-Dehydrogenase 2, der GDH sowie Komplex I, II und III der Atmungskette.^{40, 45} Neben den metabolischen Funktionen wird vermutet, dass Sirt3 Zellen vor reaktiven Sauerstoff-Spezies schützt, da es unter kalorischer Restriktion Superoxid-Dismutase 2 aktiviert.⁴⁶

Sirt5 reguliert die Detoxifikation der Zellen durch Aktivierung der Carbamoylphosphat-Synthetase 1 (CPS1), welche den ersten Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert,⁴⁷ sowie der Uratoxidase, welche Harnstoff in Allantoin umwandelt.⁴⁸ Dabei ist Sirt5 nicht nur in der Lage Acetyl-Gruppen, sondern auch andere Dicarbonsäurereste, von Lysinen abzuspalten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Sirt5 die Aktivität von CPS1 durch Desuccinylierung erhöht sowie die Aktivität von PDH und Succinatdehydrogenase reguliert.⁴⁹

2.4. Acylspezifität des humanen Sirtuin 5

Die Abspaltung von Dicarbonsäureresten ist einzigartig und wird lediglich von der mitochondrialen Isoform Sirt5 katalysiert. Die Fixierung der freien Carboxylgruppe von Succinyl- oder ähnlichen Dicarbonsäureresten wird durch Arg₁₀₅ und Tyr₁₀₂ im aktiven Zentrum gewährleistet (Abb. 3A).⁵⁰ DU *et al.* konnten zeigen, dass sich durch den Austausch von acetyliertem zu succinyliertem Lysin die katalytische Effizienz von Sirt5 um Faktor 1000 erhöht.²⁰

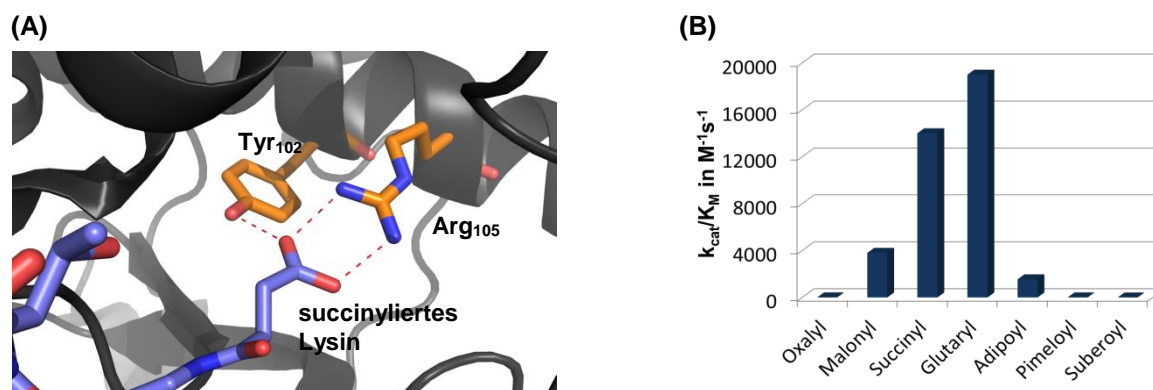


Abbildung 3. (A) Aktives Zentrum von Sirt5 (pdb-Datei 3RIY). Die freie Carboxylgruppe des succinylierten Lysins (blau) wird über eine Wasserstoffbrücke und elektrostatische Wechselwirkungen (rot) an Tyr₁₀₂ und Arg₁₀₅ (orange) im aktiven Zentrum von Sirt5 (grau) fixiert. Arg₁₀₅, Tyr₁₀₂ und succinyliertes H3K9 sind als *sticks* und Sirt5 als *cartoon* dargestellt. **(B) Kinetische Effizienzen (k_{cat}/K_M) verschiedener CPS1-Derivate.** Das zentrale Lysin des CPS1-Peptides wurde mit unterschiedlichen Dicarbonsäureamiden modifiziert. Kinetische Charakteristika wurden mittels HPLC bestimmt. Die Reaktionsansätze bestanden aus 500 μM NAD⁺, 2-100 μM CPS1-Derivat und 0.5 μM Sirt5 in 20 mM TRIS/HCl-Puffer pH 7,8 mit 150 mM NaCl und 5 mM MgCl₂.

Auf dieser Grundlage sollten mit Hilfe eines CPS1-basierten Modellpeptides, welches als Substrat in Mikroarray-Experimenten ermittelt werden konnte,¹⁸ und eines HPLC-Assays kinetische Charakterisierungen zur Ermittlung der Acylspezifität vorgenommen werden. Die ϵ -Aminofunktion des zentralen Lysins des CPS1-Peptides wurde chemisch mit unterschiedlichen Dicarbonsäuren modifiziert. Zunächst wurde die Dicarbonsäurekette systematisch verlängert, wobei Dicarboxyle von Oxalyl (2 Kohlenstoff-Atome) bis hin zu Suberoyl (9 Kohlenstoff-Atome) zur Modifikation verwendet wurden.

Vergleichend zeigte sich, dass Glutaryl als Lysin-Modifikation die höchste katalytische Effizienz aufweist (k_{cat}/K_M 19000 $M^{-1}s^{-1}$, Abb. 3B), während diese sich mit der Verkürzung oder Verlängerung der Dicarbonsäurekette verringert. Die Betrachtung der einzelnen kinetischen Parameter der Dicarbonsäureamide von Malonyl bis Adipoyl (3 – 6 Kohlenstoff-Atome) zeigte interessanterweise, dass sich lediglich der k_{cat} -Wert signifikant verändert, während der K_M -Wert vergleichbar bleibt. Dicarbonsäureamide mit Kettenlängen von 2 oder >7 Kohlenstoff-Atomen wiesen wiederum sowohl höhere K_M -Werte als auch schlechtere k_{cat} -Werte, verglichen zu Glutaryl, auf. Kristallstrukturen dieser CPS1-Derivate mit Zebrafisch Sirt5 (zSirt5) und *molecular docking* Experimente lieferten Hinweise auf die Bindung und Konformation der Modifikationen im aktiven Zentrum des Sirtuins und dessen mögliche Auswirkungen auf die Katalyse.

Weiterhin ließen die erhaltenen Kristallstrukturen mit Succinyl- oder Glutaryl-CPS1 erkennen, dass das aktive Zentrum von Sirt5 die Möglichkeit zulässt die Dicarbonsäureamide selbst zu modifizieren und damit das Substratspektrum von Sirt5 zu erweitern, beziehungsweise potente und spezifische Sirt5-Inhibitoren zu entwickeln. Die Substitution eines Wasserstoffs

an C3 von Succinyl- oder Glutaryl-Resten durch Methyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen, die Einführung von Doppelbindungen oder der Austausch einer Methylengruppe durch Heteroatome zeigten gute Substrateigenschaften. Die Verwendung größerer Substitutionen an C3 von Succinyl, wie Butyl, Fmoc oder Z, wiesen inhibitorische Eigenschaften, mit K_i -Werten im Bereich von 4-100 μM , auf. Die Doppelsubstitution 3-Methyl-3-phenylsuccinyl zeigte hierbei das höchste inhibitorische Potential sowie eine hohe Spezifität gegenüber Sirt5.

Artikelkopie „Chemische Untersuchung des aktiven Zentrums des humanen Sirtuin 5 offenbart dessen Acylspezifität und Peptid-basierte Inhibitoren“

Roessler C, Nowak T, Pannek M, Gertz M, Nguyen GT, Scharfe M, Born I, Sippl W, Steegborn C, Schutkowski M, *Chemical probing of human Sirtuin 5 active site reveals its substrate specificity and peptide-based inhibitors*, Angewandte Chemie International Edition English 53 (2014), 10728-10732.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111069>

Teil 3. Effektoren der Sirtuin-Aktivität

Innerhalb der Zelle erfüllen Sirtuine eine Vielzahl an Funktionen und stehen schon lange im Fokus pharmakologischer Untersuchungen, um neue Ansätze zur Behandlung von Krankheiten zu entwickeln. Zu diesen Krankheiten gehören metabolische Störungen, wie Diabetes oder Fettleibigkeit, neuronale Erkrankungen, wie Parkinson, oder Krebs.

Die Rolle, welche Sirtuine bei der Entstehung von Krebs spielen, wird kontrovers diskutiert. Sirtuine können sowohl einen tumorhemmenden als auch -fördernden Einfluss haben. Dabei werden entweder die Proteinmenge oder die Aktivität verschiedener Sirtuin-Isoformen verändert. Viele Studien belegen eine Beteiligung von Sirt1 an der Entstehung diverser Krebsarten. Die tumor-hemmende Wirkung von Sirt1 ist auf die Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B oder HIF-1 α , zurückzuführen.⁵¹ Die Deacetylierung von NF- κ B führt zu dessen Inaktivierung und im Folgenden zu einer vermehrten TNF α (Tumornekrose-Faktor α)-induzierten Apoptose. Des Weiteren hemmt Sirt1 indirekt die Aktivität des Apoptose-Inhibitors Survivin.⁵² Ausschlaggebend für diesen Prozess ist BRCA1, welches an den Sirt1-Promotor bindet und die Transkription von Sirt1 erhöht. Ein erhöhter Sirt1-Proteinlevel führt zur vermehrten Deacetylierung des Histons H3, was die Aktivität von Survivin beeinflusst. Im Gegenzug kann eine Mutation von BRCA1 zu einem verringerten Sirt1-Proteinlevel führen und das Tumorwachstum fördern. Neben NF- κ B und HIF-1 α reguliert Sirt1 die Aktivität anderer Tumorsuppressoren. Durch die Deacetylierung von p53 oder FOXO-Proteinen hemmt Sirt1 deren Aktivität und beeinflusst die DNA-Reparatur sowie die Apoptose, welche ein Tumorwachstum begünstigen können.^{29b, 53}

Auch Sirt2 scheint sowohl das Tumorwachstum zu begünstigen als es auch zu unterdrücken. Sirt2 *knockout* Mäuse neigen ab ihrem zehnten Lebensmonat dazu häufiger Tumore zu bilden als Wildtyp-Mäuse.⁵⁴ Diese tumorsuppressive Wirkung kann auf den Einfluss von Sirt2 auf den Zellzyklus zurückgeführt werden, da es die Aktivität von APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome*) reguliert. Eine Störung in der APC/C-Aktivität führt zu einer abnormalen Zellteilung und somit zur Bildung von Tumoren. Andererseits zeigen neue Studien, dass die Inhibierung oder der *knockdown* von Sirt2 die Bildung oder das Wachstum von Tumoren hemmt.⁵⁵ Ein Grund könnte die Aktivierung einiger Onkogene, wie K-RAS⁵⁶ oder MYC,⁵⁷ durch Sirt2 sein.

Sirt3 hingegen ist bisher nur als Tumorsuppressor bekannt. Sirt3^{-/-} MEF-Zellen (embryonale Maus-Fibroblasten) weisen eine erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies und eine erhöhte Glykolyse auf, welche die Tumorbildung und das Tumorwachstum begünstigen könnten.⁵⁸ Aber nur die Überexpression eines Onkogens, wie MYC oder K-RAS, führt zur Umwandlung der MEF-Zellen in Krebszellen.^{58a}

Die oben beschriebenen Mechanismen stehen nur beispielhaft für den Einfluss, den Sirtuine auf die Krebsentstehung haben können. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zahlreiche Sirtuin-Effektoren entwickelt. Sirtuin-Inhibitoren lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Zum einen sind dies peptidbasierte Inhibitoren, wie Fluoracetyl- oder Thioxoacyl-Peptide, und zum anderen *small molecule* Inhibitoren. Thioxoacyl-Peptide sind die derzeit effektivsten Sirtuin-Inhibitoren. Thioxoacyl-Peptide bilden während der Katalyse ein sogenanntes „gefangenes“ Intermediat aus, welches die Katalyse um das 2000-fache verlangsamt (Abb. 4).

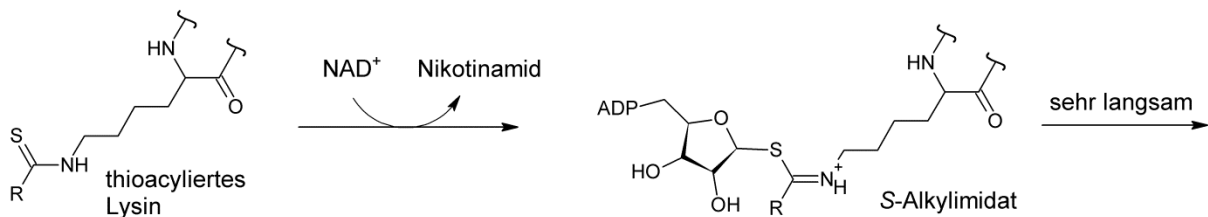


Abbildung 4. Ausbildung des S-Alkylimidat-Intermediates. Die Abspaltung von Nikotinamid und Ausbildung des S-Alkylimidats verläuft mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit wie die entsprechenden Oxo-Verbindungen. Der nachfolgende Reaktionsschritt ist 2000-mal langsamer.

Thioxoacetyl-Peptide, basierend auf den Aminosäuresequenzen von p53 oder α -Tubulin (Tub), stellen sehr effektive Inhibitoren für Sirt1, Sirt2 und Sirt3, mit IC₅₀-Werten im einstelligen mikromolaren Bereich, dar,⁵⁹ während Sirt5 und Sirt6 bis zu 100-fach schlechtere IC₅₀-Werte zeigen (Tab. 1). Aufgrund der Acylspezifität von Sirt5 und Sirt6 wurden Thioxosuccinyl- und Thioxomyristoyl-Peptide entwickelt, deren IC₅₀-Werte bis zu 40-fach geringer sind als die entsprechenden Thioxoacetyl-Peptide.⁶⁰ Im Gegensatz zu Thioxosuccinyl-Peptiden sind Thioxomyristoyl-Peptide keine spezifischen Inhibitoren, sondern hemmen neben Sirt6 auch Sirt1, Sirt2 und Sirt3 (Tab. 1).^{60b}

Tabelle 1. IC₅₀-Werte für die Hemmung der Sirtuin-Aktivität durch thioxoacylierte Peptide.

	Sirt1	Sirt2	Sirt3	Sirt5	Sirt6	Quelle
H3 K ₁₄ -TAc ^a	2,0	5,6	2,3	-	-	59a
Tub K ₄₀ -TAc ^b	5,0	29,0	-	-	-	59b
p53 K ₃₈₂ -TAc ^c	0,3	6,4	-	-	-	59b
H3 K ₉ -TMyr ^d	4,4	2,6	5,6	-	1,7	60b
TNF α K ₂₀ -TMyr ^e	5,3	2,3	4,5	-	2,8	60b
H3 K ₉ -TAc ^f	1,0	2,0	2,0	>100	-	60a
H3 K ₉ -TSucc ^g	>100	>100	>100	5,0	-	60a

^a H-KSTGGK(TAc)APRKQ-OH; ^b H-SDK(TAc)TI-OH; ^c H-HKK(TAc)LM-OH; ^d H-ARK(TMyr)ST-OH; ^e H-PKK(TMyr)TG-OH; ^f H-KQTARK(TAc)STGGKA-OH; ^g H-KQTARK(TSucc)STGGKA-OH

Fluoracetyl-Peptide hemmen die Sirtuin-Katalyse durch reine Konkurrenz mit dem Peptidsubstrat. Aufgrund der sich am Acetyl befindlichen Fluor-Atome wird die Nukleophilie des Acyl-Sauerstoffs herabgesetzt, wodurch dieser die ADP-Ribose des NAD⁺ nicht mehr effektiv

angreifen kann.^{59a} Dieser Effekt wurde von YAMAGATA *et al.* genutzt, um einen Sirt2 spezifischen Inhibitor zu entwickeln. Mit Hilfe der RaPID-Technologie (*random nonstandard peptide integrated discovery*) konnten mehrere trifluoracetylierte makrozyklische Peptide designiert werden, welche IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich aufweisen.⁶¹ Eines dieser zyklischen Peptide (S2iL5) besitzt eine besonders hohe Effektivität und Affinität gegenüber Sirt2, welche auf der Interaktion des Inhibitors mit einem Sirt2-spezifischen Loop (AS 289-304) basiert.⁶²

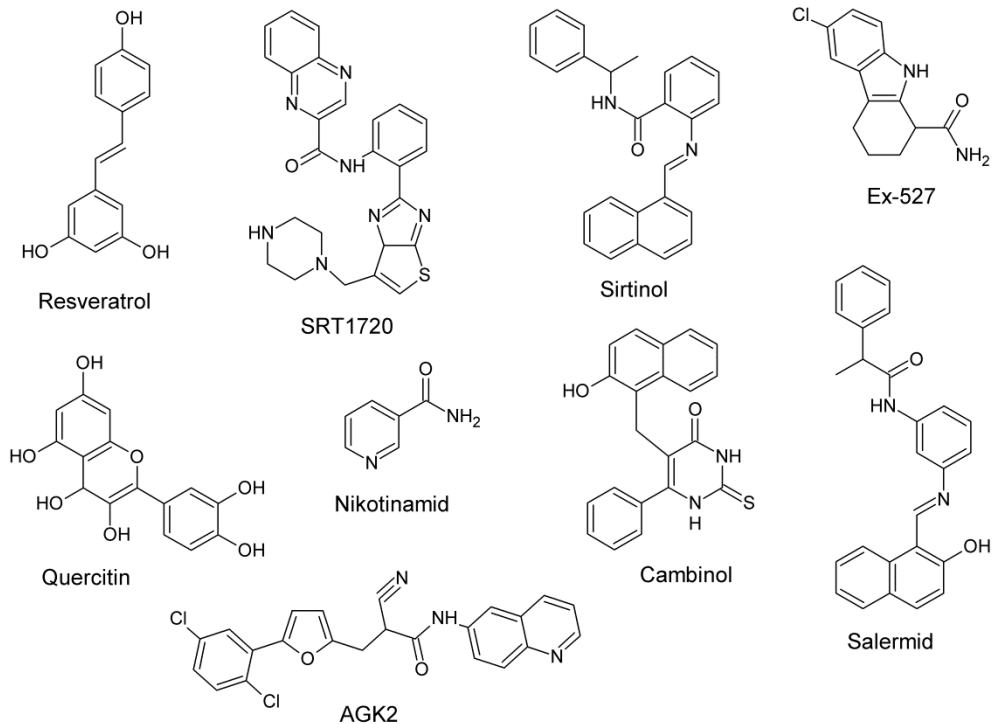


Abbildung 5. Chemische Strukturen verschiedener Sirtuin-Effektoren.

Neben den peptidbasierten Inhibitoren existieren zahlreiche *small molecule* Inhibitoren, die in den meisten Fällen aus einem oder mehreren aromatischen oder heterozyklischen Ringen aufgebaut sind. Zu diesen gehören Nikotinamid, Ex-527, Sirtinol, Suramin, Salermide, Cambinol, Quercetin und AGK2 (Abb. 5).

Nikotinamid (NAM) ist ein unspezifischer Sirtuin-Inhibitor. Dieser ist als Reaktionsprodukt in der Lage in höheren Konzentrationen die Katalyse zu hemmen. NAM bindet in der sogenannten C-Tasche (Abb. 6A) des aktiven Zentrums, wobei die Carboxamid-Funktion des Nikotinamides durch die konservierten Aminosäuren Aspartat und Isoleucin fixiert wird, während sich der Pyridinring frei in der C-Tasche bewegen kann.⁶³ NAM kann nach dessen Freisetzung erneut an das Sirtuin binden und mit dem O-Alkylimidat die Rückreaktion eingehen. Die Sensitivität der Sirtuin-Isoformen gegenüber NAM ist sehr unterschiedlich. Während die IC_{50} -Werte für Sirt1, Sirt2 und Sirt3 im Bereich von 50-100 μ M liegen,⁶⁴ wurde für Sirt6 ein Wert von 2,2 mM nachgewiesen.⁶⁵ FISCHER *et al.* konnten zeigen, dass die NAM-Inhibierung

von Sirt5 acylspezifisch ist. Bei der Verwendung von acetylierten Peptiden beträgt der IC_{50} -Wert 7 mM, während sich dieser bei succinylierten Substraten auf 21 μ M verringert.^{64c}

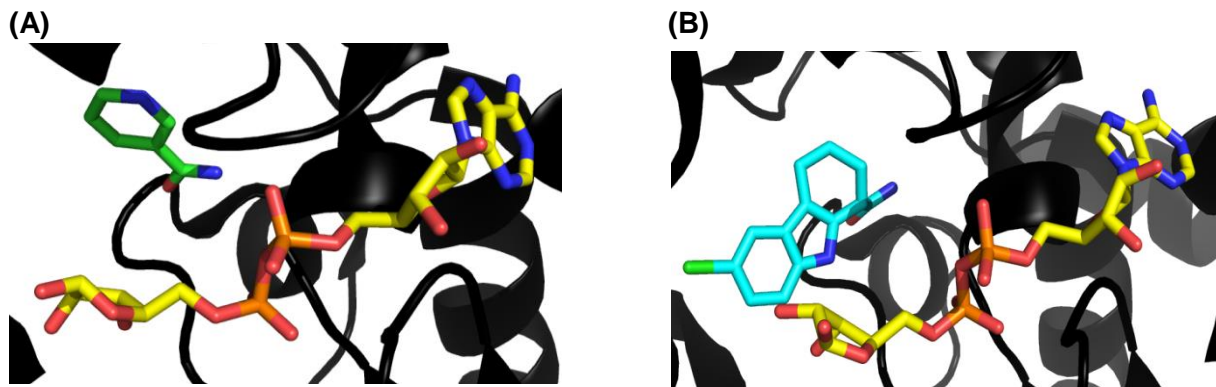


Abbildung 6. NAM und Ex-527 binden in der C-Tasche von Sirtuinen. (A) Kristallstruktur von Sir2Af2 mit gebundenem Nikotinamid und ADP-Ribose (1YC2). (B) Kristallstruktur von Sirt3 mit Ex-527 und ADP-Ribose (4BV3). Das Sirtuinmolekül ist in der Cartoon-Darstellung in grau abgebildet. ADP-Ribose ist in gelb, NAM in grün und Ex-527 in cyan dargestellt.

Ex-527 ist ein weiterer Inhibitor, der in der C-Tasche bindet (Abb. 6B).⁶⁶ Dieser ist zellpermeabel und spezifisch für Sirt1 (IC_{50} -Wert 98 nM).⁶⁷ Die Inhibition von Sirt1 durch Ex-527 führt *in vivo* zur Hyperacetylierung von p53, welches eine wichtige Rolle im DNA-Reparatursystem spielt.⁶⁷ Biochemische und kristallographische Untersuchungen konnten den Inhibitionsmechanismus aufklären. Ex-527 kann nur an das Enzym binden, wenn sich das O-Alkylimidat-Intermediat ausgebildet hat und Nikotinamid abgespalten wurde.⁶⁶

Auch die Inhibitoren Sirtinol, Cambinol und Salermide wurden auf ihre *in vivo* Wirksamkeit getestet. Alle drei Inhibitoren sind spezifisch für Sirt1 und Sirt2 mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich.^{55, 68} Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Sirtinol das Zellwachstum von Brust- oder Lungenkrebszellen (MCF-1 oder H1299) hemmt⁶⁹ beziehungsweise einige Tumorzelllinien empfänglicher für die Aufnahme von Chemotherapeutika macht.⁷⁰ Für einen anderen selektiven Sirt2-Inhibitor, AGK2 (IC_{50} -Wert 3,5 μ M), konnte gezeigt werden, dass dieser in einem Drosophila Model für Parkinson neuronale Zellen vor dem Zelltod schützt.⁷¹ In C6 Gliomzellen führt die durch AGK2-induzierte Hemmung von Sirt2 zur Caspase 3-abhängigen Apoptose.⁷²

Mit Hilfe neuer Analyse-Verfahren konnten viele Sirtuin-Effektoren gefunden werden. Beispielsweise wurden für Sirt6 in Pflanzenextrakten neue Effektoren, wie Quercetin oder Vitexin, nachgewiesen, welche die Deacetylierung von H3K9 (Histon H3 Lysin 9) inhibieren.⁷³

Neben der Inhibition von Sirtuinen könnte auch die Aktivierung verschiedener Isoformen ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente sein. Zudem wird schon lange diskutiert, dass eine erhöhte enzymatische Aktivität von Sirtuinen die Alterung von Zellen verzögern kann. Beispielsweise konnte der Einfluss von Sirt6 auf die Lebensdauer von Mäusen

nachgewiesen werden. Sirt6 *knockout* Mäuse weisen frühzeitige Alterungsprozesse auf und sterben meist nach einem Monat Lebensdauer.⁷⁴ Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass nur männliche Mäuse, die Sirt6 überexprimieren, eine höhere Lebenserwartung zeigen als Wildtypmäuse.⁷⁵

Neben SRT1720 und verschiedenen Polyphenolen (Abb. 5),⁷⁶ ist Resveratrol einer der bekanntesten Sirtuin Aktivatoren, welches in einigen Pflanzen und Rotwein vorkommt. Einige Studien zeigen, dass Resveratrol sich positiv auf die Lebenserwartung von Hefen und Mäusen auswirkt. Zahlreiche *in vitro* Studien zeigen einen widersprüchlichen Einfluss von Resveratrol auf die Sirtuin-Aktivität.⁷⁶⁻⁷⁷ Kürzlich wurde nachgewiesen, dass der aktivierende oder inhibierende Effekt gegenüber Sirt1 substratspezifisch ist. Nur Substrate, welche aromatische Aminosäuren oder Fluorophore in +1 Position zum Substrat-Lysin besitzen, zeigen erhöhte Aktivität in Gegenwart von Resveratrol.⁷⁸

3.1. Sirtuin 2 spezifische Inhibitoren

Ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente ist die Isoform Sirt2, da ein abnormales Sirt2-Level oder die Fehlfunktion des Enzyms verschiedene metabolische Krankheiten zur Folge haben kann. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Inhibitoren entdeckt worden, welche größtenteils nur wenig charakterisiert sind.^{71, 79} Oftmals sind diese Inhibitoren nicht selektiv, zu wenig wirksam oder, aufgrund ihrer Struktur, nicht zur zellulären Anwendung geeignet. Dies macht die Entwicklung und Charakterisierung neuer Sirtuin-selektiver Effektoren zu einem wichtigen Arbeitsgebiet.

Ein Ansatzpunkt ist die Untersuchung oder das Screening großer Bibliotheken chemischer Verbindungen. Hierbei konnten Aminothiazole als Hemmstoffe für Sirt2 nachgewiesen werden. Vor allem das Aminothiazol SirReal2 (*Sirtuin rearranging ligand 2*) zeigte einen IC₅₀-Wert im nanomolaren Bereich, welcher sowohl mit einem Fluoreszenz-Assay als auch mit einem HPLC-Assay verifiziert werden konnte. Neben seiner hohen Selektivität weist dieser Inhibitor ein 38-fach höheres inhibitorisches Potential auf als AGK2. Zudem konnte SirReal2 als selektiver *in vivo* Inhibitor bestätigt werden, in dem der Acetylierungsstatus von α -Tubulin und p53 sowie das Proteinlevel von BubR1 überprüft wurden.

Strukturell zeigte sich, dass SirReal2 mit einer neuen, bisher unbekannten, Bindestelle (Selektivitätsbindetasche) interagiert, welche zwischen der Rossmann-Spalte und der Zink-Bindedomäne liegt. SirReal2 wirkt als molekulare Klammer, welche zu einer Umordnung einiger Aminosäuren des aktiven Zentrums führt. Dies hat zur Folge, dass beide Substrate gebunden werden können, aber das acetylierte Lysin des Peptides in eine unproduktive Konformation gezwungen wird. Die Selektivität von SirReal2 gegenüber Sirt2 beruht auf der Einzigartigkeit der Selektivitätsbindetasche, welche bei Sirt5 und Sirt6 nicht vorhanden und bei Sirt1 und Sirt3 eine andere Struktur aufweist.

Artikelkopie „Selektive Sirt2 Inhibition durch Liganden-induzierte Umlagerung des aktiven Zentrums“

Rumpf T, Schiedel M, Karaman B, Roessler C, North B, Lehotzky A, Olah J, Ladwein K, Schmidtkunz K, Gajer M, Pannek M, Steegborn C, Sinclair D, Gerhardt S, Ovadi J, Schutkowski M, Sippl W, Einsle O, Jung M, *Selective Sirt2-inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site*, Nature Communications Feb 12 (2015), 6:6263.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25672491>

Teil 4. Bestimmung der Sirtuin-Aktivität

4.1. Assay-Systeme

Die Entwicklung und Charakterisierung neuer Effektoren ist eine zentrale Aufgabe auf dem Gebiet der Sirtuine. Zuverlässige Messverfahren sind notwendig, um neue Effektoren zu untersuchen, sowie die Funktionen und Substrate der Sirtuin-Isoformen zu ermitteln.

Erste Messverfahren basierten auf der radioaktiven Markierung der Substrate oder auf massenspektrometrischen (MS) Analysen. Mehr als 6000 Acetylierungsstellen konnten mittels Tandem MS Proteomanalysen entdeckt und die Aktivität von Sirtuinen auf den zellulären Acetylierungsstatus und deren Substratproteine ermittelt werden. Eine Vielzahl weiterer Assays zur Untersuchung der Sirtuin-Aktivität existiert, die prinzipiell in zwei Gruppen eingeteilt werden können: 1) Assays, die den Substratverbrauch oder die Produktbildung messen und 2) Assays, die auf der Trennung von Substrat und Produkt beruhen. Zur zweiten Gruppe gehören Messtechniken, wie chromatographische Methoden, Kapillarelektrophorese, Gelelektrophorese, die Bindung an Polymere oder die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Messverfahren der ersten Gruppe weisen eines der Substrate (acetyliertes Lysin, NAD⁺) oder ein Produkt (NAM, freies Lysin, ADP-Ribose) nach. Der Nachweis kann mit Hilfe chemischer Modifikation der Verbindungen, der Kopplung an weitere enzymatische Reaktionen oder spezifische Antikörper erfolgen.

Jedes dieser Messverfahren besitzt Vor- und Nachteile. Trotz der Vielzahl an existierenden Sirtuin-Assays können nur wenige kontinuierlich eingesetzt werden und dienen nur der Endpunktbestimmung. Oft limitieren auch ein hoher Zeitaufwand, ein hoher Materialverbrauch oder hohe Anschaffungskosten für Messgeräte einige Assays.

Dennoch konnten mit Hilfe der Messverfahren die Funktion und der Mechanismus von Sirtuinen aufgeklärt und zahlreiche Effektoren der Sirtuin-Aktivität entwickelt und charakterisiert werden.

Artikelkopie „Neue Assays und Anwendungen zur Entwicklung von Sirtuin Effektoren“

Schutkowski M, Fischer F, Roessler C, Steegborn C, *New assays and approaches for discovery and design of Sirtuin modulators*, Expert Opinion Drug Discovery 9 (2014), 183-199.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24382304>

4.2. Fluoreszenz-basierte Sirtuin-Assays

4.2.1. Protease-gekoppelte Assays

Einer der bekanntesten Sirtuin-Assays beruht auf der Kopplung der Sirtuin-Reaktion an eine nachfolgende Protease-Reaktion. Das als Fluor-de-Lys[®] (FdL) kommerziell erhältliche Messverfahren beruht auf der Substratspezifität der Protease Trypsin. Trypsin spaltet spezifisch C-terminal der Aminosäure L-Lysin. Ist die ε-Aminofunktion des Lysins modifiziert, zum Beispiel acetyliert, ist Trypsin nicht in der Lage die Bindung zu hydrolysieren. Die Peptide, welche im FdL als Substrate eingesetzt werden, sind C-terminal mit 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) modifiziert, welches nach Deacylierung fluoresziert. Die Kopplung der Sirtuin-Reaktion an eine nachfolgende Protease-Reaktion ermöglicht somit die Messung der Sirtuin-Aktivität über eine Fluoreszenzänderung. Abwandlungen des Assays nutzen ein FRET-Substrat (Förster Resonanz Energie Transfer) mit 6-TAMRA (Tetramethylrhodamin-6-carbonsäure) und QSY-7 oder Dabcyl und Edans als Fluorophor-Quencher-Paar.⁸⁰

Nachteilig am klassischen FdL Assay ist die Verwendung sehr kurzer Peptide (meist 2-4 Aminosäuren). Diese artifiziellen Peptide, welche sehr schlechte Substrate für Sirtuine sind, können unerwünschte Interferenzen bei der Analyse von Effektoren hervorrufen.⁸¹ Die schlechten Substrateigenschaften gegenüber Sirtuinen führen zu langen Reaktionszeiten und der Verwendung hoher Enzymkonzentrationen. Aufgrund langer Reaktionszeiten und dem Einsatz großer Mengen der Hilfsprotease wird der Assay meist diskontinuierlich angewendet. Zudem limitieren Enzymkonzentrationen, welche in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie das Peptidsubstrat eingesetzt werden müssen, die Auswertung nach Michaelis-Menten. Diese Limitation kann bei der Charakterisierung von Effektoren zu falschen Ergebnissen führen.

Die Einschränkungen des FdL machen es notwendig neue effiziente und einfache Messverfahren zu entwickeln, welche mit geringen Enzymkonzentrationen auskommen und als Hochdurchsatzsystem angewendet werden können. Der neu entwickelte Sirtuin-Assay nutzt auch die Kopplung der Sirtuin- an eine Trypsinreaktion. Die systematische Entwicklung und Optimierung eines intern gequenchten CPS1-Peptidsubstrates führte zu einem glutarylierten Substrat, welches für Sirt5 eine katalytische Effizienz von $337000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufweist und damit das beste bisher bekannte Sirtuin-Substrat darstellt. Aufgrund der sehr guten Substrateigenschaften für Sirt5 konnten Messungen mit einer Sirtuin-Konzentration von 10 nM durchgeführt und der Assay als Hochdurchsatzverfahren im Mikrotiterplatten-Format angewendet werden. Dies erlaubt die verlässliche Bestimmung von K_i -Werten verschiedener Sirtuin-Inhibitoren. Zudem ließen sich die Assay-Bedingungen auf Sirt2 und Sirt3 übertragen.

Manuskriptkopie „Ein neuer kontinuierlicher Assay für die Deacylase Sirt5 und anderer Deacetylasen“

A novel continuous assay for the deacylase Sirtuin 5 and other deacetylases

Claudia Roessler,[†] Christian Tüting,[†] Marat Meleshin,[†] David Rauh,[†]
Clemens Steegborn,[‡] Mike Schutkowski^{*,†}

[†] Department of Enzymology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 3, 06120 Halle (Saale), Germany

[‡] Department of Biochemistry, University of Bayreuth, Universitaetsstrasse 30, 95447 Bayreuth, Germany

Abstract: Sirtuins are NAD⁺ dependent lysine deacylases involved in many regulatory processes like control of metabolic pathways, DNA repair and stress response. Modulators of sirtuin activity are needed as tools for uncovering the biological function of these enzymes and as potential therapeutics. Systematic discovery of such modulators is hampered by the lack of efficient and simple continuous activity assays running at low sirtuin concentrations in microtiter plates. Here we describe an improved continuous sirtuin 5 assay based on the coupling of the sirtuin reaction to a proteolytic cleavage using internally fluorescence-quenched substrates. Systematic optimization of a carbamoyl phosphate synthetase 1 derived, glutarylated peptide yielded a Sirt5 substrate with k_{cat}/K_M -value of 337000 M⁻¹s⁻¹ which represents the best sirtuin substrate described so far. These extraordinary substrate properties allowed reliable determination of K_i -values for different inhibitors in the presence of only 10 nM sirtuin in microtiter plate format. Assay conditions could be transferred effectively to other lysine deacetylases, like sirtuin 2 and sirtuin 3 which now enables more efficient development of sirtuin targeting drugs.

Introduction

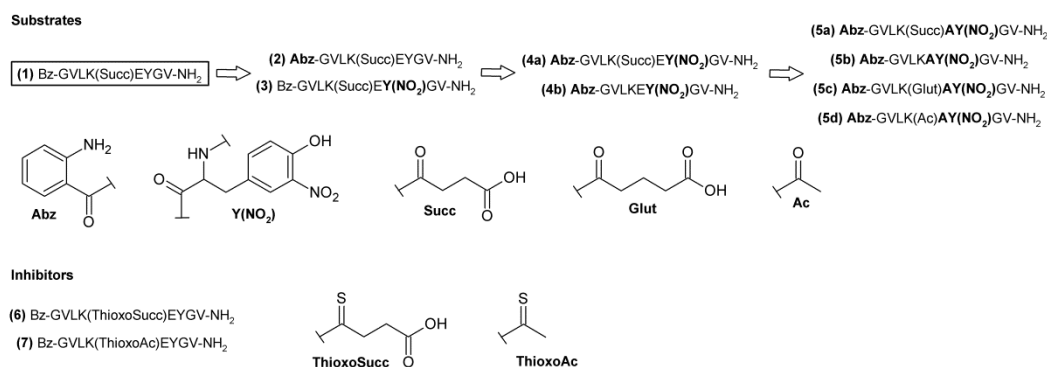
Protein lysine acetylation is one of the most abundant posttranslational modifications (PTM), involved in many cellular processes.^{1,2} The level of lysine acetylation is regulated by acetyltransferases and deacetylases. Besides acetylation, recent studies found other acylations as *in vivo* PTMs. This includes propionylation,^{3,4} succinylation,^{5,6} malonylation,^{6,7} glutarylation,⁸ crotonylation,⁹ butyrylation³ and myristoylation.¹⁰ The generation of these PTMs is enigmatic at least in mitochondria because there were no classical acetyltransferases found in this compartment. Recent work demonstrated that these acyl-transfers might happen spontaneously with acyl-CoAs or acylphosphates as acyl-donors.¹¹⁻¹³ More is known about the removal of such acyl moieties. Sirtuins, a conserved family of NAD⁺-dependent lysine deacetylases, have different deacetylation activities besides removing acetyl residues.^{14,15} For example, the mitochondrial sirtuin 5 (Sirt5) has a ~1000-fold higher catalytic efficiency for succinylated and glutarylated lysine residues as compared to acetylated lysines,^{7,8,15,16} whereas Sirt6 prefers long acyl chains, like myristoylated lysine side chains.¹⁴ Additionally, it was shown *in vivo* that Sirt4 is able to remove lipoic acid and biotin residues from active site lysines both *in vitro* and *in vivo*¹⁷ and Sirt3 seems to be the *in vivo* decrotonylase.¹⁸ Sirtuin-dependent deacetylation regulates many metabolic processes, such as fatty acid synthesis, glucose homeostasis and stress response,¹⁹ and Sirtuins are involved in diseases like diabetes, cancer and neurodegeneration,¹⁹ making these enzyme attractive targets for drug discovery.

For the systematic development of sirtuin effectors, reliable and efficient high-throughput assays are necessary. Several assays were developed based on the separation of product and substrate (HPLC, CE)²⁰⁻²² or spectrometric detection of one reaction compound²³⁻²⁶ which are in most cases discontinuous.²⁷ Nevertheless, there are continuous sirtuin activity assays described, coupling the sirtuin reaction to either additional enzymatic reactions,^{25,28} chemical reactions like intramolecular transesterifications,²⁹ DNA interaction³⁰ or fluorescence enhancement by oligomerization/precipitation.³¹ One of the most common assays determines released nicotinamide, which is transformed to nicotinic acid and ammonia by nicotinamidase. Ammonia can be converted with NAD(P)H and α -ketoglutarate by glutamate dehydrogenase (GDH) leading to a UV-signal.²⁵ This complex enzymatic cascade and the many substrates involved, however, limit the measurement range of the assay and make it more sensitive to interference in compound tests. Generally, the deacetylated peptide product could be quantified by coupling to a lysine-recognizing protease reaction.²⁸ Subsequent to sirtuin mediated deacylation of the respective lysine residue the used helper protease is able to hydrolyze the lysinyl-chromophore/fluorophore amide bond leading to a signal increase. This principle is used in the so-called Fluor-de-Lys assay, but the fluorophore replacing the C-terminal peptide part renders this substrate highly artificial and has been reported to cause artifacts in compound tests.³² Because of the protease needed for the assay it is mostly used discontinuously and because of the suboptimal substrate properties for the sirtuins it is extremely time consuming (up to 2h for both the sirtuin and the protease reaction).

Table 1: Kinetic constants for Sirt5 mediated desuccinylations.

substrate	K_M [μ M]	k_{cat} [10^{-3} s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
H3 K9-Succ ^{a,20}	5.8 ± 2.7	25 ± 2	4300
GDH K503-Succ ^{b,20}	14.0 ± 4.0	28 ± 2	2000
ACS2 K628-Succ ^{c,20}	450 ± 150	268 ± 51	600
H4 K12-Succ ^{d,82}	33.0 ± 1.8	30	920
Ac-K(Succ)-AMC ⁸²	84.0 ± 22.0	9	110
Z-K(Succ)-AMC ⁸³	14.7 ± 1.8	n.d.	n.d.
CPS1 K527-Succ (1) ^{e,84}	3.8 ± 0.6	53 ± 2	14000

^a histone H3; H-KQTARK(Succ)STGGWW-OH; ^b glutamate dehydrogenase, H-SGASEK(Succ)DIVHSGWW-OH; ^c acetyl-CoA synthetase 2, H-KTRSGK(Succ)VMRRWW-OH; ^d histone H4, Ac-LGK(Succ)-AMC; ^e carbamoyl phosphate synthetase 1, Bz-GVLK(Succ)-EYGV-NH₂.



Scheme 1. CPS1-peptide derivatives.

Madsen *et al.* used this assay principle in a continuous manner³³ but the substrates showed very low catalytic efficiencies for Sirt5 (Table 1, entries H4 K12-Succ and Ac-K(Succ)-AMC). To shorten reaction times in such assays based on weak substrates, high amounts (up to 4 μ M) of sirtuin are often used in activity assays.¹⁴ This limits the validity of the Michaelis-Menten-equation, which has the pre-requisite that enzyme concentration has to be much lower than substrate concentration. Therefore, measurements with sirtuin concentrations in the range of the used substrate concentration will yield incorrect kinetic constants. Moreover, reliable determination of IC₅₀- or K_i-values is impossible for strong binding inhibitors under such conditions. Therefore much better sirtuin substrates are needed for reliable determination of K_i-values for strong binding inhibitors. Such assays would ideally allow a real-time monitoring for increased data accuracy and applicable in a parallel measurement mode for convenient collection of larger sets of activity data for enzymatic studies and drug development campaigns.

Results and Discussion

For substrate optimization we started with a succinylated peptide (**1**) derived from carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1), which was discovered to be a super-substrate for Sirt5 using a peptide microarray approach³⁵ and which represents in the *N*-terminally benzoylated form the best substrate described so far for Sirt5 (Scheme 1).²² We wanted to introduce fluorophore and quencher moieties into the CPS1-peptide by minimal modification of the structure avoiding unfavorable interaction of the substrate with the active site of Sirt5. Inspection of Sirt5 co-crystallized with **1** (pdb 4UTN) revealed that the benzoyl moiety of **1** does not contact Sirt5 and that there is some space around the tyrosine side chain in +2 position for additional functionalities. Thus, we substituted the *N*-terminal benzoyl moiety by 2-aminobenzoyl-residue (Abz) generating a fluorophore (**2**). Alternatively, we introduced a nitro-group to the tyrosine side chain in meta-position (**3**) transforming this residue into an efficient quencher (Y(NO₂)) without changing its alpha-amino acid nature within the peptide. Finally, we combined both modifications in one sequence resulting in an internally fluorescence-quenched peptide derivative (**4a**). This combination of fluorophore and quencher within one peptide sequence results in a very efficient assay for protease activity.³⁶ Obviously, these modifications of **1** did not negatively influence the substrate properties for Sirt5 as shown in Figure 1. The helper protease trypsin disfavors negatively charged side chains in P1'-position³⁷ leading to high K_M-value for **4b**, the product of the Sirt5 mediated desuccinylation of **4a** (Figure S1). Therefore we exchanged the glutamate by an alanine leading to the derivatives **5a** and **5b**. This modification has no influence on Sirt5 catalysis (Figure 1)

but clearly improves both K_M and k_{cat} value for trypsin (Table S1). This optimized substrate should allow the efficient coupling of deacetylation reaction and detection reaction (Scheme 2) possibly even in a continuous assay (see below).

Optimal emission- and excitation wavelengths of the reaction product mixture for fluorescence detection were determined via a 3D-spectrum, which was obtained from fully hydrolyzed **5b** (Figure S2). The reaction could be followed at an excitation wavelength of 320 nm and an emission wavelength of 420 nm. A fluorescence signal change could be observed only when all components of the reaction are added. Reactions without trypsin, NAD⁺ or sirtuin showed no change in fluorescence intensity (Figure 2a).

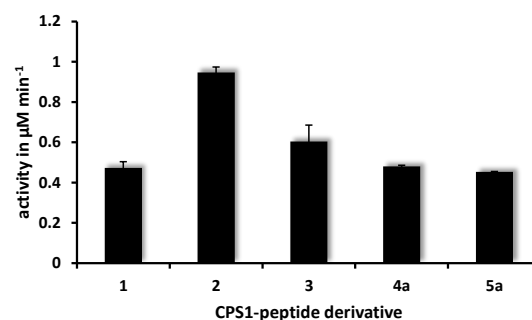
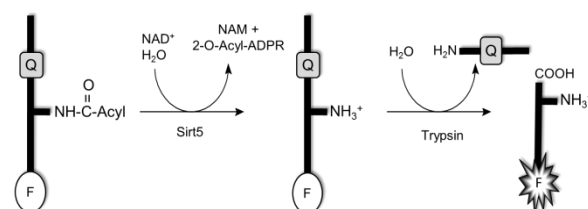


Figure 1. Sirt5-activity against different CPS1-peptide-derivatives (**1-5a**). Data were obtained by end point measurements after 1h reaction time. 100 μ M peptide, 500 μ M NAD⁺ and 0.1 μ M Sirt5 was incubated at 37 °C. All measurements were done in duplicates.

Scheme 2. Assay principle.



Sirt5 removes acyl-residue from lysine side chain. Trypsin hydrolyses peptide C-terminal of lysine thereby separating fluorophore and quencher.

A Sirt5 concentration series showed linear correlation between enzyme amount and activity against **5a**, confirming that the assay signal is an accurate measure of sirtuin catalysis. The results showed that already 10 nM Sirt5 more than 20-times less than recommended for the FdL assay are sufficient to get a reliable fluorescence change in less than 5

min, which represents a paramount improvement of existing sirtuin activity assays. For trypsin a concentration of 0.01 mg mL^{-1} was chosen to assure that trypsin reaction is not limiting in the coupled assay (Figure S3). Additionally, we tested whether trypsin is able to hydrolyse Sirt5 during the reaction. Treatment of Sirt5 with trypsin for different times followed by sirtuin activity measurements with HPLC indicates that Sirt5 activity is not influenced significantly for up to 5 hours exposure to protease (Figure S4). This stability against trypsin and the improved substrate properties of **5b** for the helper protease enabled us to monitor the kinetics of Sirt5 mediated desuccinylation of **5a** in a continuous format. Subsequent to pre-incubation of NAD^+ and **5a** in buffer at 37°C for 5 min trypsin was added followed by Sirt5, and the reaction was then monitored continuously through fluorescence detection. This setup enabled sensitive real-time monitoring of Sirt5-dependent substrate deacylation to generate **5b**, which is instantly hydrolyzed by trypsin separating fluorophore and quencher and thereby leading to increased fluorescence (Scheme 2). Progress curves were analyzed through linear regression resulting in initial velocities for different substrate concentrations. Relative fluorescence units (RFU) could be transformed into molecular reaction velocity with a calibration curve (Figure S5). The initial velocity rates were plotted against substrate concentrations and kinetic values were determined using the Michaelis-Menten-equation (Figure 3, Table 2). The catalytic efficiency for **5a** is 17.5-fold higher as compared to the best known succinylated Sirt5 substrate **1**.²²

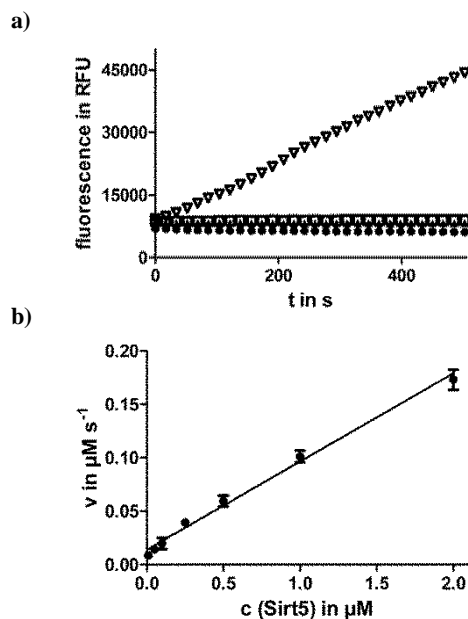


Figure 2. (a) Change of fluorescence intensity under different conditions. Data were obtained for **5a**. ● without trypsin; □ without Sirt5; ▲ without NAD^+ ; ▽ all components included. (b) Reaction velocity is dependent on Sirt5 concentrations (10–200 nM). All reactions were done in triplicates.

We confirmed this result by determining the kinetic constants for **5a** using an HPLC-assay (Table 2). Additionally, we determined kinetic constants for co-substrate NAD^+ using the novel fluorescence-based assay and **5a** at saturating conditions (Table 2, Figure S6). The relatively low K_M -value of $26 \mu\text{M}$ is comparable to the described K_M -value for NAD^+ determined at saturating conditions with **1** using an HPLC-based assay.²² Recently, Feldman *et al.* revealed a correlation between acyl chain length and NAD^+ K_M -values for Sirt1–3 and Sirt6 and suggested that the removal of long-chain acyl modification is not influenced by NAD^+ levels

within a cell. A similar relationship could be applicable to Sirt5 while using succinylated substrates.

Sirt5 was shown to be an efficient deglutarylase *in vitro* and *in vivo*.^{8,22} Therefore we combined this acyl moiety with our assay principle leading to **5c**. The kinetic efficiency of **5c** is 1.2-times higher than for **5a** (Table 2).

We tested the performance of this novel Sirt5 assay in parallel, higher-throughput setups by determining K_I -values for inhibitors. It was shown that Sirt5 is insensitive for nicotinamide (NAM) inhibition if analyzed with an acetylated substrate but inhibited by NAM with a succinylated peptide as substrate.³⁹ Nevertheless, there are no K_I -values published for NAM. We determined the inhibition constant for NAM against peptide substrate **5a** and NAD^+ analyzing kinetic constants in the presence of different inhibitor concentrations ranging between 0 to $200 \mu\text{M}$. For peptide **5a** V_{max} -values are decreasing with inhibitor concentration, whereas K_M -values are similar (Figure 4). These results indicate a non-competitive type of inhibition. Linear fitting of V_{max}^{-1} against inhibitor concentration plot leads to a K_I -value of $15 \pm 1.5 \mu\text{M}$ as an x-axis intercept (Figure S7), which is comparable to published IC_{50} -values.³⁹ In contrast NAM-inhibition against NAD^+ showed a competitive behavior with a K_I -value of $3.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$. This value was received from a plot of K_M -value versus inhibitor concentration, where also the x-axis intercept represents the negative K_I -value (Figure S7). Generally, the determined K_I -values for NAM and Sirt5 are relatively low as compared to other sirtuin isoforms. There was no effect of NAM on the helper enzyme trypsin ruling out that inhibition of the protease generates false good K_I -values.

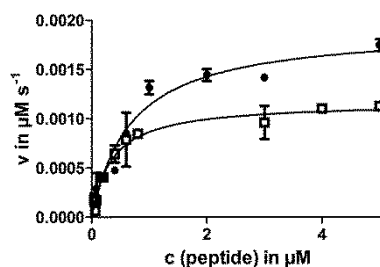


Figure 3. Michaelis-Menten plot for Sirt5 mediated deacylation of **5a** (●) and **5c** (□). Fluorescence was measured in 96-well microtiter plates. Solid lines represent fit to Michaelis-Menten-equation. All reactions were done in duplicates.

Table 2: Kinetic constants for **5a**, **5c** and NAD^+ measured with Sirt5.

	K_M [μM]	k_{cat} [10^{-3}s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
5a	0.69 ± 0.1^a	200 ± 10^a	290000^a
	0.9 ± 0.2^b	103 ± 34^b	114000^b
NAD^{+c}	26 ± 6^a	91 ± 7^a	3400^a
5c	0.35 ± 0.07^a	117 ± 7^a	337000^a

^a determined using 96-well microtiter plate reader, ^b determined with HPLC, ^c Kinetic values for NAD^+ were measured with saturated substrate **5a**.

Replacement of the acyl oxygen atom by a sulphur transforms sirtuin substrates into inhibitors by the formation of a “stalled” intermediate with ADP-ribose which resembles a bi-substrate inhibitor.^{40,41} Previously it was shown that peptides containing thiosuccinylated lysines are specific Sirt5 inhibitors.^{42,43} This prompted us to synthesize CPS1-derivatives with either thioacetyl (**7**) or thiosuccinyl (**6**) moieties at the lysine side chain. The K_I -values for peptide derivatives **6** and **7** were measured using **5a** as a substrate. As shown in Figure S8 **7** is not able to inhibit Sirt5 up to $150 \mu\text{M}$ whereas **6** represent a strong and potent Sirt5 inhibitor with a K_I -value of $<10 \text{ nM}$.

Recently Li *et al.* showed that Sirt1 can be activated by treatment with $500 \mu\text{M}$ leucine,⁴⁴ which is responsible for the prevention of metabolic diseases in high-fat diet-induced obese mice. To analyze whether Sirt5 might also be amenable to activation by leucine, we treated Sirt5 with 0– $500 \mu\text{M}$

leucine and followed the desuccinylation of **5a**. There is no significant influence of leucine to the Sirt5 reaction visible (Figure S9).

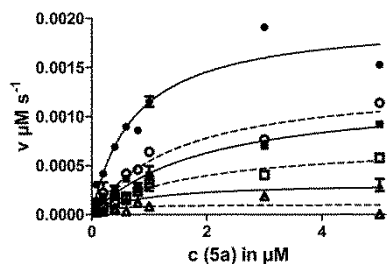


Figure 4: Michaelis-Menten plot for the inhibition by NAM. Reactions were performed with varying concentrations of **5a**, 0–200 μM NAM and saturating NAD^+ . Fluorescence was measured using microtiter plate reader. All reactions were done in duplicates. NAM concentrations: ● 0 μM ; ○ 25 μM ; ■ 50 μM ; □ 100 μM ; ▲ 150 μM ; △ 200 μM .

Encouraged by the extraordinary catalytic efficiencies of **5a** and **5c** for Sirt5 we wondered whether this peptide sequence would yield similar results for other sirtuin isoforms and thus allow comparable assays, with sensitive and continuous detection. Therefore, we synthesized an acetylated version of our substrate peptide (**5d**). The stability of Sirt2 and Sirt3 against trypsin was analyzed in a similar manner like for Sirt5 and again showed that the sirtuins are stable for at least 1 h (Figure S10). Determination of the kinetic constants showed similar values for Sirt2 compared to Sirt5 (Table 3, Figure S11), and an about 100-fold lower catalytic efficiency for Sirt3. Nevertheless, the substrate is more efficiently recognized than the widely used Fluor-de-Lys substrate by Sirt2 and also Sirt3, indicated by K_M -values for **5d** that are 60-fold (Sirt2) and 8-fold (Sirt3) lower as compared to the FdL substrate.⁴⁵ These results demonstrate that our improved, sensitive and continuous Sirt5 assay is also applicable to Sirt2 and Sirt3 and enables simple, continuous and sensitive measurement of their activity. These assays now enable the efficient and accurate characterization of larger sets of sirtuins and their modulators as required, e.g., in drug development campaigns.

Table 3: Kinetic constants for Sirt2 and Sirt3 with **5d**.

	K_M [μM]	k_{cat} [10^{-3}s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]
Sirt2	3.0 ± 0.5	130 ± 7.0	43000
Sirt3	4.1 ± 0.7	12 ± 0.7	3000

Conclusion

In summary, we created a continuous assay using internally fluorescence-quenched peptides **5a** and **5c**, which are highly specific and efficient substrates for Sirt5. The catalytic efficiencies of the developed Sirt5 substrates are several hundred-fold higher as compared to the commercially available Sirt5-substrate (Table 1) and the specificity constant for **5c** represents the best substrate described for a sirtuin so far. This high specificity constant makes it possible to use sirtuin concentrations down to 10 nM saving both enzyme and assay time, and allowing reliable kinetics and inhibition studies even for tight binding ligands. The assay principle could be transferred to following Sirt2 and Sirt3 activity by changing the acyl moiety at the lysine side chain to acetyl (**5d**). The sensitivity of the substrates **5a**, **5c** and **5d** enables effective screenings for novel effectors of sirtuin activity in microtiter plate format in a continuous manner. No complex liquid handling steps are needed for stopping reactions. They thus enable a simple and robust setup for screening and

analyzing of modulators for Sirtuins, a highly interesting target family for which currently only few specific modulators are available.

Experimental Section

Chemicals and general methods. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich if not stated otherwise. For HPLC measurements 0.1 % TFA in H_2O (solvent A) and 0.1 % TFA in ACN (solvent B) were used. Compounds were detected at 260 nm. An Agilent 1100 HPLC was used for analytical analysis with a quaternary pump, a well-plate autosampler and a variable wavelength detector. Separations were performed on a Phenomenex Kinetex™ XB C-18 (2.6 μm , 3.0 x 50 mm) column with a linear gradient from 25 % to 55 % solvent B in 4 min (flowrate: 0.6 mL min^{-1}). For purification of peptides a Merck Hitachi Speed LC system with a Phenomenex Kinetex™ 5 μM XB-C18 column (100 Å, 21.2 x 250 mm) was used. Separations were performed with a linear gradient from 20 % to 50 % solvent B in 60 min (8 mL min^{-1}). Identity of eluted compounds was analyzed by MALDI mass spectrometry on Bruker Ultraflex-II-TOF/TOF with MALDI source.

Solid phase peptide synthesis. All peptides were synthesized using standard Fmoc chemistry on a MBHA Rink amide resin (IRIS Biotech). Fmoc-Lys(Nosyl)-OH was used as orthogonally protected building block allowing selective on-resin modification of lysine side chain. Resin was treated with DMF for 10 min. Fmoc deprotection was performed for 15 min with 20 % piperidine in DMF followed by washings with DMF (5 min, 5 times). 4 eq amino acid derivatives (Merck) were activated with 4 eq HBTU and 8 eq DIPEA in DMF. Finally, amino-group of glycine was modified with 4 eq benzoic acid (**1**, **3**, **6**, **7**) and 8 eq DIPEA in DMF or 4 eq 2-aminobenzoic acid, 4 eq HBTU and 8 eq DIPEA in DMF (**2**, **4a-b**, **5a-d**). Lysine protection group Nosyl- (2-nitrobenzenesulfonyl-) was removed using thiophenol and DBU in DMF. Free lysine side chain was modified with 4 eq succinic anhydride (**1-3**, **4a**, **5a**), glutaric acid(**5c**), acetic anhydride (**5d**) and 8 eq DIPEA in DMF. For compounds **6** and **7** methyl-dithiomethyl- succinate and ethyl-dithioacetate, respectively, were used for thioacylation of deprotected lysine side chains. After washing with DCM, methanol and again DCM (3min, 5 times each) peptides were cleaved from resin with 98 % TFA (Roth) and precipitated with cold diethyl ether. After purification by reversed phase HPLC, purity and identity were checked with analytical HPLC and MALDI-MS.

HPLC activity assay. Deacylation of CPS1-peptides were performed at 37 °C in 20 mM TRIS buffer pH 7.8 containing 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 and 5 % DMSO (assay buffer). Reaction mixtures consist of 500 μM NAD^+ , 0.5 – 10 μM peptide and 0.01 μM Sirt5. After several time points reaction was stopped with 10 % TFA (v/v) and samples were measured by HPLC. Stability of Sirt2, Sirt3 and Sirt5 was determined by incubating 0.01 μM sirtuin with 0.01 mg mL^{-1} trypsin at 37 °C followed by activity measurements after different pre-treatment times with 5 μM **5a** or **5d** in the presence of 500 μM NAD^+ . All measurements were done in duplicates.

Fluorescence activity assay. Reactions were measured in black low-binding 96-well microtiter plates (NUNC) and contained 500 μM NAD^+ , 0.04 – 5 μM peptide, 0.01 μM – 0.1 μM sirtuin and 0.01 mg mL^{-1} trypsin in assay buffer for the determination of kinetic values. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 320 nm and emission wavelength of 420 nm. The analysis of kinetic values for NAD^+ was performed equally. The reactions contained 10 μM **5a** and varying concentrations of NAD^+ (5 – 500 μM). Nicotinamide concentrations from 25 – 200 μM were used for determination of K_i -value. The influence of leucine on sirtuin reaction was checked by end point measurements with 0 – 500 μM leucine, 500 μM NAD^+ , 5 μM **5a**, 0.01 μM Sirt5 and 0.01 mg mL^{-1} trypsin. Calibration curve was determined after overnight digestion of **5b** at concentration from 0.04 – 5 μM with trypsin. Optimal enzyme concentrations for the assay were obtained by changing trypsin concentration from 0.05 to 2 μM and Sirt5 concentrations from 0.01 to 2 μM and measuring activity with 500 μM NAD^+ and 50 μM **5a**.

Enzymes. Human Sirt2, Sirt3 and Sirt5 were expressed and purified as described by Gertz and coworkers.³² Porcine trypsin was purchased from Sigma-Aldrich.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Additional figures and tables showing determination of kinetic constants and stability of sirtuins against trypsin as well as further detailed experimental information. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +49 345 5524828, E-mail:
mike.schutkowski@biochemtech.uni-halle.de

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgment

We thank BMBF (ProNet-T3) for financial support. Dr. Angelika Schierhorn is gratefully acknowledged for MS-spectrometry, Dr. Ilona Born for the synthesis of some peptide derivatives, Theresa Nowak for helpful discussions and Helga Ungar for technical support.

Abbreviations

Abz, 2-amino benzoic acid; ACS2, acetyl-coenzymeA synthetase 2; AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; CE, capillary electrophoresis; CPS1, carbamoyl phosphate synthetase 1; DIPEA, *N,N*-diisopropylethylamine; FdL, Fluor-de-Lys; Fmoc, 9-Fluorenylmethoxy carbonyl; GDH, glutamate dehydrogenase; Glut, glutaryl; H3, histone 3; H4, histone 4; HBTU, *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate; MBHA, 4-methylbenzylhydramine; NAM; nicotinamide; PTM, posttranslational modification; RFU, relative fluorescence unit; Sirt2, sirtuin 2; Sirt3, sirtuin 3; Sirt5, sirtuin 5; Succ, succinyl; TFA, trifluoro acetic acid; Thioac, thioacetyl; Thiosucc, thiosuccinyl; Y(NO₂), 3-nitro tyrosine; Z, benzyl oxycarbonyl.

References and Notes

- Choudhary, C.; Weinert, B. T.; Nishida, Y.; Verdin, E.; Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 536-550.
- Zhao, S.; Xu, W.; Jiang, W.; Yu, W.; Lin, Y.; Zhang, T.; Yao, J.; Zhou, L.; Zeng, Y.; Li, H.; Li, Y.; Shi, J.; An, W.; Hancock, S. M.; He, F.; Qin, L.; Chin, J.; Yang, P.; Chen, X.; Lei, Q.; Xiong, Y.; Guan, K. L. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* **2010**, *327*, 1000-1004.
- Chen, Y.; Sprung, R.; Tang, Y.; Ball, H.; Sangras, B.; Kim, S. C.; Falck, J. R.; Peng, J.; Gu, W.; Zhao, Y. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol. Cell Proteomics* **2007**, *6*, 812-819.
- Garrity, J.; Gardner, J. G.; Hawse, W.; Wolberger, C.; Escalante-Semerena, J. C. N-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30239-30245.
- Zhang, Z.; Tan, M.; Xie, Z.; Dai, L.; Chen, Y.; Zhao, Y. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 58-63.
- Xie, Z.; Dai, J.; Dai, L.; Tan, M.; Cheng, Z.; Wu, Y.; Boeke, J. D.; Zhao, Y. Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol. Cell Proteomics* **2012**, *11*, 100-107.
- Peng, C.; Lu, Z.; Xie, Z.; Cheng, Z.; Chen, Y.; Tan, M.; Luo, H.; Zhang, Y.; He, W.; Yang, H.; Zhang, Y.; Ro, J.; Wagner, G. R.; Green, M. F.; Madsen, A. S.; Schmiesing, J.; Peterson, B. S.; Xu, G.; Ilkayeva, O. R.; Muehlbauer, M. J.; Bralke, T.; Muhlhausen, C.; Backos, D. S.; Olsen, C. A.; McGuire, P. J.; Pletcher, S. D.; Lombard, D. B.; Hirsche, M. D.; Zhao, Y. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Glyc. Metab.* **2014**, *19*, 605-617.
- Tan, M.; Luo, H.; Lee, S.; Jin, F.; Yang, J. S.; Montellier, E.; Buchou, T.; Cheng, Z.; Rousseaux, S.; Rajagopal, N.; Lu, Z.; Ye, Z.; Zhu, Q.; Wysocka, J.; Ye, Y.; Khochbin, S.; Ren, B.; Zhao, Y. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **2011**, *146*, 1016-1028.
- Stevenson, F. T.; Bursten, S. L.; Fanton, C.; Locksley, R. M.; Lovett, D. H. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 7245-7249.
- Wagner, G. R.; Payne, R. M. Widespread and enzyme-independent N-epsilon-acetylation and N-epsilon-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 29036-29045.
- Weinert, B. T.; Iesmantavicius, V.; Wagner, S. A.; Scholz, C.; Gummesson, B.; Beli, P.; Nystrom, T.; Choudhary, C. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 265-272.
- Kuhn, M. L.; Zemaitaitis, B.; Hu, L. I.; Sahu, A.; Sorensen, D.; Minasov, G.; Lima, B. P.; Scholle, M.; Mrksich, M.; Anderson, W. F.; Gibson, B. W.; Schilling, B.; Wolfe, A. J. Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation. *PLoS One* **2014**, *9*, e94816.
- Feldman, J. L.; Baeza, J.; Denu, J. M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacetylation by mammalian sirtuins. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31350-31356.
- Du, J.; Zhou, Y.; Su, X.; Yu, J. J.; Khan, S.; Jiang, H.; Kim, J.; Woo, J.; Kim, J. H.; Choi, B. H.; He, B.; Chen, W.; Zhang, S.; Cerione, R. A.; Auwerx, J.; Hao, Q.; Lin, H. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* **2011**, *334*, 806-809.
- Park, J.; Chen, Y.; Tishkoff, D. X.; Peng, C.; Tan, M.; Dai, L.; Xie, Z.; Zhang, Y.; Zwaans, B. M.; Skinner, M. E.; Lombard, D. B.; Zhao, Y. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol. Cell* **2013**, *50*, 919-930.
- Mathias, R. A.; Greco, T. M.; Oberstein, A.; Budayeva, H. G.; Chakrabarti, R.; Rowland, E. A.; Kang, Y.; Shenk, T.; Cristea, I. M. Sirtuin 4 is a lipamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* **2014**, *159*, 1615-1625.
- Bao, X.; Wang, Y.; Li, X.; Li, X. M.; Liu, Z.; Yang, T.; Wong, C. F.; Zhang, J.; Hao, Q.; Li, X. D. Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *Elife* **2014**, *3*, e02999.
- Haigis, M. C.; Guarente, L. P. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 2913-2921.
- Fan, Y.; Scriba, G. K. Electrophoretically mediated microanalysis assay for sirtuin enzymes. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 3874-3880.
- Tanner, K. G.; Landry, J.; Sternglanz, R.; Denu, J. M. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 14178-14182.
- Roessler, C.; Nowak, T.; Pannek, M.; Gertz, M.; Nguyen, G. T.; Scharfe, M.; Born, I.; Sippl, W.; Steegborn, C.; Schutkowski, M. 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*, 10728-10732.
- Marcotte, P. A.; Richardson, P. L.; Guo, J.; Barrett, L. W.; Xu, N.; Gunasekera, A.; Glaser, K. B. Fluorescence assay of SIRT protein deacetylases using an acetylated peptide substrate and a secondary trypsin reaction. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 90-99.
- Hubbard, B. P.; Gomes, A. P.; Dai, H.; Li, J.; Case, A. W.; Considine, T.; Riera, T. V.; Lee, J. E.; E, S. Y.; Lamming, D. W.; Pentelute, B. L.; Schuman, E. R.; Stevens, L. A.; Ling, A. J.; Armour, S. M.; Michan, S.; Zhao, H.; Jiang, Y.; Sweitzer, S. M.; Blum, C. A.; Disch, J. S.; Ng, P. Y.; Howitz, K. T.; Rolo, A. P.; Hamuro, Y.; Moss, J.; Perni, R. B.; Ellis, J. L.; Vlasuk, G. P.; Sinclair, D. A. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* **2013**, *339*, 1216-1219.
- Smith, B. C.; Hallows, W. C.; Denu, J. M. A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Anal. Biochem.* **2009**, *394*, 101-109.
- Wolfson, N. A.; Pitcairn, C. A.; Sullivan, E. D.; Joseph, C. G.; Fierke, C. A. An enzyme-coupled assay measuring acetate production for profiling histone deacetylase specificity. *Anal. Biochem.* **2014**, *456*, 61-69.
- Schutkowski, M.; Fischer, F.; Roessler, C.; Steegborn, C. New assays and approaches for discovery and design of Sirtuin modulators. *Expert Opin Drug Discov.* **2014**, *9*, 183-199.
- Wegener, D.; Wirsching, F.; Riestler, D.; Schwienhorst, A. A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 61-68.
- Baba, R.; Hori, Y.; Mizukami, S.; Kikuchi, K. Development of a fluorogenic probe with a transesterification switch for detection of histone deacetylase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14310-14313.
- Minoshima, M.; Matsumoto, T.; Kikuchi, K. Development of a fluorogenic probe based on a DNA staining dye for continuous monitoring of the histone deacetylase reaction. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7925-7930.
- Dhara, K.; Hori, Y.; Baba, R.; Kikuchi, K. A fluorescent probe for detection of histone deacetylase activity based on aggregation-induced emission. *Chem. Commun. (Camb.)* **2012**, *48*, 11534-11536.
- Gertz, M.; Nguyen, G. T.; Fischer, F.; Suenkel, B.; Schlicker, C.; Franzel, B.; Tomaschewski, J.; Aladini, F.; Becker, C.; Wolters, D.; Steegborn, C. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One* **2012**, *7*, e49761.
- Madsen, A. S.; Olsen, C. A. Substrates for efficient fluorometric screening employing the NAD-dependent sirtuin 5 lysine deacetylase (KDAC) enzyme. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5582-5590.
- Maurer, B.; Rumpf, T.; Scharfe, M.; Stofla, D. A.; Schmitt, M. L.; He, W.; Verdin, E.; Sippl, W.; Jung, M. Inhibitors of the NAD(+)-dependent Protein Desuccinylase and Demalonylase Sirt5. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 1050-1053.
- Rauh, D.; Fischer, F.; Gertz, M.; Lakshminarasimhan, M.; Bergbrede, T.; Aladini, F.; Kambach, C.; Becker, C. F.; Zerweck, J.; Schutkowski, M.; Steegborn, C. An acetylation peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2327-2337.
- Meldal, M.; Breddam, K. Anthranilamide and nitrotyrosine as a donor-acceptor pair in internally quenched fluorescent substrates for endopeptidases: multicolumn peptide synthesis of enzyme substrates for subtilisin Carlsberg and pepsin. *Anal. Biochem.* **1991**, *195*, 141-147.
- Kozlov, I. A.; Melnyk, P. C.; Hachmann, J. P.; Srinivasan, A.; Shults, M.; Zhao, C.; Musmacker, J.; Nelson, N.; Barker, D. L.; Lebl, M. A high-complexity, multiplexed solution-phase assay for profiling protease activity on microarrays. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2008**, *11*, 24-35.
- Satoh, A.; Stein, L.; Imai, S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, *206*, 125-162.
- Fischer, F.; Gertz, M.; Suenkel, B.; Lakshminarasimhan, M.; Schutkowski, M.; Steegborn, C. Sirt5 deacetylation activities show differential sensitivities to nicotinamide inhibition. *PLoS One* **2012**, *7*, e45098.
- Fatkins, D. G.; Monnot, A. D.; Zheng, W. N-epsilon-thioacetyl-lysine: a multi-facet functional probe for enzymatic protein lysine N-epsilon-deacetylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3651-3656.

- (41) Smith, B. C.; Denu, J. M. Mechanism-based inhibition of Sir2 deacetylases by thioacetyl-lysine peptide. *Biochemistry* **2007**, *46*, 14478-14486.
- (42) He, B.; Du, J.; Lin, H. Thiosuccinyl peptides as Sirt5-specific inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1922-1925.
- (43) Zhou, Y.; Zhang, H.; He, B.; Du, J.; Lin, H.; Cerione, R. A.; Hao, Q. The bicyclic intermediate structure provides insights into the desuccinylation mechanism of human sirtuin 5 (SIRT5). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28307-28314.
- (44) Li, H.; Xu, M.; Lee, J.; He, C.; Xie, Z. Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**, *303*, E1234-1244.
- (45) Kiviranta, P. H.; Suuronen, T.; Wallen, E. A.; Leppanen, J.; Tervonen, J.; Kyrylenko, S.; Salminen, A.; Poso, A.; Jarho, E. M. N(epsilon)-thioacetyl-lysine-containing tri-, tetra-, and pentapeptides as SIRT1 and SIRT2 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2153-2156.

4.2.2. Kontinuierliche direkte Assays

Von den vielen Messverfahren zur Bestimmung der Sirtuin-Aktivität existieren nur wenige, die kontinuierlich durchgeführt werden können. Diese kontinuierlichen Assays knüpfen die Sirtuin-Reaktion eine weitere enzymatische oder chemische Reaktion,^{62a, 85} an die Interaktion mit DNA⁸⁶ oder an eine Oligomerisierung / Präzipitation.⁸⁷ Kopplungsreaktionen können die Anwendung eines Assays limitieren und Artefakte bei der Charakterisierung von Effektoren hervorrufen. Daher wäre die Entwicklung eines Assays, bei welchem die Sirtuin-Reaktion direkt mitverfolgt und welcher ohne die Hilfe von Kopplungsreaktionen auskommt, von Vorteil. Auf der Grundlage der Kristallstrukturen von Sirt6 und Sirt2 mit einem myristoylierten beziehungsweise thioxomyristoylierten H3-Peptid, sollte für die Entwicklung eines direkten Assays ein kleiner Fluorophor (2-Aminobenzoessäureamid) in die Acylkette eingebaut werden. Um ein intern gequenches Substrat zu generieren, wurde in die Peptidkette der Quencher 3-Nitrotyrosin eingeführt. Als Peptidgrundgerüst wurde ein TNF α -Peptid gewählt, dessen myristoylierte Form (Peptid **1a**) als Vergleichspeptid diente. Die systematische Optimierung der Acylkette ergab, dass eine Kettenlänge von elf Kohlenstoff-Atomen sehr gute Substrateigenschaften gegenüber Sirt1-Sirt6 zeigt. Mit dem neu entwickelten Peptid (**3**) konnten sogar kinetische Messungen mit Sirt4 durchgeführt werden, was aufgrund der geringen Sirt4-Deacylase-Aktivität bisher schwierig war. Für Sirt2 weist Peptid **3** die höchste katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) auf, die bisher veröffentlicht wurde.

Die Anwendung des neuen Assays im Mikrotiterplattenformat ermöglichte die schnelle und effektive Charakterisierung verschiedener Inhibitoren. Dazu gehören die *small molecule* Inhibitoren NAM, Quercitin und Ex-527 sowie die Peptidinhibitoren S2iL5 und thioxoacylierte Peptide. Für letztere konnte zudem der Einfluss sowohl des *trans*- als auch des *cis*-Isomers ermittelt werden.

Zur weiteren Optimierung des Assays wurde zum einen ein größerer Fluorophor in die Acylkette eingebaut und zum anderen die Position von Fluorophor und Quencher innerhalb der Peptidkette getauscht.

Manuskriptkopie „Der erste direkte und kontinuierliche Sirtuin Assay“

First direct and continuous sirtuin activity assay

Sabine Schuster^{1*}, Claudia Roessler^{1*}, Marat Meleshin¹, Philipp Zimmermann^{1,2}, Zeljko Simic¹, Christian Kambach⁴, Cordelia Schiene-Fischer³, Clemens Steegborn⁴, Michael O. Hottiger⁵, Mike Schutkowski¹

¹ Department of Enzymology, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle/Saale (Germany), E-mail: mike.schutkowski@biochemtech.uni-halle.de

² Present address: Department of Biotechnology, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle/Saale (Germany)

³ Department of Enzymology, joint research project gFP5, Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle/Saale (Germany)

⁴ Department of Biochemistry, University of Bayreuth, Universitaetsstr. 30, 95447 Bayreuth (Germany)

⁵ IVBMB, University of Zurich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich

* These authors contributed equally to this work.

Abstract

Sirtuins represent NAD⁺ dependent lysine deacylases involved in many regulatory processes like control of metabolic pathways, DNA repair and stress response. Modulators of sirtuin activity are needed as tools for uncovering the biological function of these enzymes and as potential therapeutics. Systematic discovery of such modulators is hampered by the lack of direct and continuous activity assays. We describe a novel continuous assay based on the increase of a fluorescence signal subsequent to sirtuin mediated removal of a fluorescent acyl chain from a TNF α -derived peptide derivative. This substrate is well recognized by human sirtuins 1-6 and represents with a k_{cat}/K_M -value of $176\ 000\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for sirtuin 2 the best sirtuin substrate described so far. These extraordinary substrate properties allowed for the first time determination of K_i -values for the specific Sirt2 inhibitory peptide S2iL5 and for the quasi-universal sirtuin inhibitor peptide thioxo myristoyl TNF α (80 nM).

Introduction

Reversible acylation of protein lysine residues is one of the most abundant posttranslational modifications (PTMs) involved in several cellular processes like metabolic regulation, cell cycle control and epigenetics^{1,2}. Lysine acetylation is determined by the enzymatic activity of lysine acetyltransferases and lysine deacetylases. Recent studies detected alternative acylations as *in vivo* PTMs, including propionylations^{3,4}, succinylations^{5,6}, malonylations^{6,7}, glutarylations⁸, crotonylations⁹, butyrylations³, 2-hydroxyisobutyrylations¹⁰, phosphoglycerations¹¹ and myristoylations¹². The generation of these PTMs is not fully understood but it could be demonstrated that some of these acyltransfers represent spontaneous reactions with acyl-CoAs or acylphosphates as acyl-donors forming stable amide bonds¹³⁻¹⁵. Removal of such acyl moieties from lysine side chains is catalyzed by either zinc ion dependent lysine deacetylases or by a conserved family of NAD⁺-dependent lysine deacylases, known as sirtuins. The mitochondrial

sirtuin 5 (Sirt5) has several hundred-fold higher catalytic efficiency for succinylated and glutarylated lysine residues as compared to acetylated lysines^{7,8,16,17}, whereas Sirt6 prefers long acyl chains, like myristoylated lysine side chains^{18,19}. Recently, it was demonstrated that Sirt4 is able to remove lipoyl and biotinyl residues from lysine side chains both *in vitro* and *in vivo*²⁰ and Sirt3 seems to be an *in vivo* decrotonylase, besides its established deacetylase function²¹. Additionally, it was shown that Sirt2 has demyristoylase^{22,23} and depalmitoylase activity²⁴. Sirtuin mediated deacetylation reactions regulate several metabolic processes, such as fatty acid synthesis, glucose homeostasis and stress response²⁵. Moreover, sirtuins are involved in diseases like diabetes, cancer and neurodegeneration²⁵, making these enzyme attractive targets for pharmacological modulation.

For the efficient development of sirtuin effectors, reliable and ideally continuous high-throughput assays are necessary. Several existing and in most cases discontinuous activity assays (reviewed in²⁶) are based on the separation of products and substrates (HPLC, CE)²⁷⁻²⁹ or spectrophotometric detection of one reaction component³⁰⁻³³. Nevertheless, continuous activity assays are known coupling the sirtuin reaction to either an additional enzymatic reaction^{32,34}, a chemical reaction like intramolecular transesterification³⁵, an interaction with DNA³⁶ or to fluorescence enhancement by aggregation-induced emission^{37,38}.

For microtiter plate (MTP)-based assay formats the sirtuin reaction is currently coupled to enzymatic reactions either sensing the released nicotinamide³², the remaining NAD⁺³⁹ or the deacylated peptide product³⁴. One advantage of monitoring sirtuin-mediated release of nicotinamide is the compatibility to any substrate including proteins and also to any type of lysine acylation. The enzymatic cascade needed for signal generation, however, limits the linear range of the assay and makes it more sensitive to interference in compound tests as observed for GW5074, a

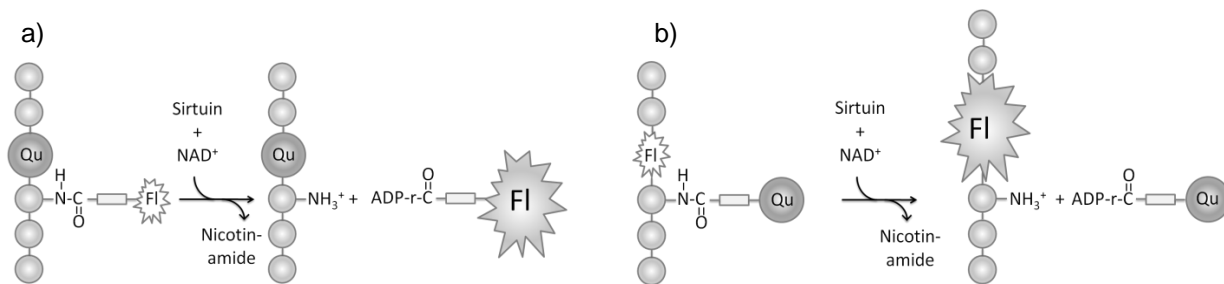


Figure 1. a) Sirtuin-mediated deacylation reaction transfers fluorescently labeled acyl residue from lysine side chain to ADP-ribose. b) Sirtuin-mediated deacylation reaction transfers quencher-containing acyl residue from lysine side chain to ADP-ribose. In both cases sirtuin activity causes increase in fluorescence signal.

Sirt5 inhibitor that also affects GDH activity⁴⁰. Hubbard et al. substituted the last enzymatic step by a chemical reaction sensing ammonia allowing more accurate activity determinations^{31,41}.

Sensing the deacylated product of the sirtuin reaction focused on the subsite specificity of proteases like Trypsin, which has a strong preference for positively charged side chains in the P1-position and thus do not cleave the acylated substrates of the sirtuin-mediated reaction. This principle was introduced using peptidyl-7-amino-4-methyl-coumarin derivatives⁴². Subsequent to deacylation of the peptidyl moiety the bond between the C-terminus of the peptidyl moiety and the amino-coumarin derivative could be hydrolyzed by the helper protease thereby releasing the highly fluorescent 7-amino-4-methyl-coumarin.

This assay is very sensitive⁴² but makes use of sirtuin substrates with suboptimal K_M values and it often has to be performed discontinuously because of the susceptibility of sirtuins against digestion by the helper protease. Appropriate substrates have been synthesized for assaying sirtuin isoforms active against acetylated⁴², succinylated⁴³, glutarilated⁸, adipoylated⁸ or myristoylated Lys residues⁴⁴. The fluorophore replacing the C-terminal peptide part renders these substrates highly artificial and has been reported to cause artifacts in compound tests.^{26,45-47} Improved substrates for Sirt1 and Sirt2 were reported using FRET by introducing tetramethylrhodamine as a fluorophore and QSY-7 as a quencher at the N- and C-terminus, respectively, of a p53 derived peptide³⁰ or recently for Sirt5 and Sirt6 incorporating Dabcyl and EDANS into a glutamate dehydrogenase derived peptide sequence^{48,49}. Nevertheless, these assays were still used in an end-point assay mode.

Relatively high amounts (up to 4 μM) of sirtuin are used in activity assays to correct for suboptimal substrate properties¹⁸. This limits the applicability of the Michaelis-Menten equation, which is valid only if enzyme concentration is much lower than substrate concentration. Consequently, all determinations of catalytic constants with high sirtuin concentrations relative to the used substrate concentration will result in incorrect kinetic constants. Additionally, because of the high enzyme concentrations, reliable estimation of IC_{50} - or K_I -values is difficult for inhibitors with affinities far below the enzyme concentration.

Results

It was demonstrated that sirtuins 1-6 are able to remove mid-chain acyl residues like octanoyl-, decanoyl- and

myristoyl-moieties from lysine side chains in histone H3 derived model peptides^{18,50}. Recently, using a similar histone H3 peptide substrate, it could be demonstrated that Sirt1-3 are able to remove myristoyl residues from lysine side chains²³ and Sirt2 represents a very efficient demyristoylase²². This fact and inspection of the crystal structures of a myristoylated histone H3 peptide in complex with Sirt6¹⁹, the crystal structure of Sirt2 co-crystallized with myristoylated histone H3 substrate or myristoylated TNF α -substrate⁵⁰, and the crystal structure of a thioxo myristoylated TNF α derived inhibitor bound to Sirt2²² enforced us to test if the hydrophobic channel on the surfaces of Sirt6¹⁹, and Sirt2^{22,24,50} can accommodate small fluorophores, like 2-aminobenzoylamides, to create a direct and continuous sirtuin activity assay. If accepted by sirtuins, replacement of one amino acid residue within the TNF α derived substrate by a 3-nitrotyrosine residue as a quencher moiety should yield a peptide derivative increasing its fluorescence subsequent to sirtuin treatment in the presence of NAD^+ (Fig. 1).

We synthesized peptides derived from the TNF α sequence which are used as model substrates^{19,22,23} or inhibitors^{22,23} for different sirtuin isoforms (Fig. 2 and 4). N-acyl-protection at one lysine residue for selective on-resin modification of this side chain and Fmoc-based solid phase peptide chemistry was used (see supplementary information for details). The peptide **1a** represents the best Sirt6 substrate described so far¹⁹.

We analyzed the substrate properties of **1a** and **2a** for Sirt6 using an HPLC-based activity assay to see if the quencher moiety is accepted by the enzyme. Controls without NAD^+ under identical conditions yielded no conversion of substrates. Inspection of the kinetic constants (Fig. S3) uncovers that the replacement of threonine in +1 position of the substrate by the quencher moiety 3-nitrotyrosine did not influence the turnover number and minimally disturbs the apparent affinity to the active site of Sirt6 as reflected by the almost comparable K_M values for **1a** (6 μM) and **2a** (17 μM).

We also tested sirtuins 1-5 and found that **1a** represents a universal sirtuin substrate with k_{cat}/K_M values in the range of 10 to 50 000 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Supplementary Tab. S2). Therefore, we reasoned that we could use the fatty acid chain as an attachment point for the very small fluorophore 2-aminobenzoylamide. Systematic variation of the distance (number of bonds) between the amide bond on the lysine side chain and the 2-amino-benzoylamide moiety (i.e. **3**, **4**, **4a**) demonstrates good substrate properties for **3** only. Peptide **4**

showed no detectable substrate properties for sirtuins 1 and 3-7 but some activity for Sirt2 in an HPLC based end-point activity assay.

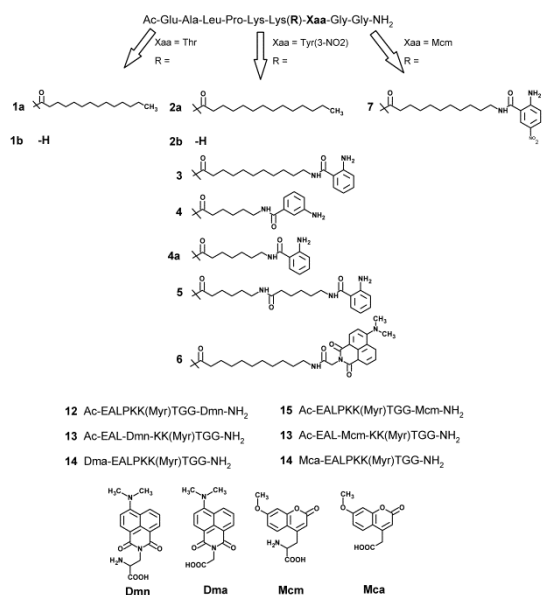


Figure 2. Structures of synthesized substrates.

However, increasing the number of methylene groups to place the fluorophore to a different position yielded improvement in substrate properties for Sirt2 with an optimum for **3**. Further elongation of the spacer resulted in dramatic decrease of substrate properties for Sirt2 (Tab. 1) and complete loss of activity for sirtuin isoforms 1, and 3-6. Substrate **3** represents a quasi-universal sirtuin substrate because it is recognized by isoforms 1-6. Only Sirt7 is not able to recognize substrate **3** pointing to structural differences of the hydrophobic channel accommodating the acyl chain. It resulted in slightly decreased substrate properties for sirtuins 1, 3, 4, 5, and 6 as compared to **1a** but interestingly yielded an improved substrate for Sirt2 with a specificity constant of more than $175\,000\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ representing the best Sirt2 substrate described so far (Tab. 2).

Table 1. Kinetic constants for **3**, **4**, **4a** and **5** and Sirt2.

Substrate	K_M [μM]	$10^{-3} \times k_{\text{cat}}$ [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	Distance (No. of bonds)
4	17.7 ± 1.5	4.0 ± 0.1	$224^{[a]}$	6
4a	1.2 ± 0.1	45.4 ± 1.8	$38\,600^{[b]}$	8
3	0.1 ± 0.02	23.8 ± 0.8	$176\,000^{[a]}$	11
5	15.3 ± 2.7	2.4 ± 0.1	$156^{[b]}$	13

[a] measured using fluorescence spectrophotometer, [b] measured using MTP fluorescence reader (see supporting information for details).

Sirtuin mediated transformation of **3** into **2b** could be followed directly and continuously at excitation wavelength of 310 nm and recording fluorescence at 405 nm using a fluorescence spectrometer (Supplementary Fig. S4). Without

NAD^+ in the presence of sirtuin, or without sirtuin in the presence of NAD^+ no significant change in fluorescence signal over time could be observed (Supplementary Fig. S4) indicating that the observed fluorescence change results directly from sirtuin-mediated deacylation and not from unspecific interactions between NAD^+ and/or sirtuin and **3**.

The slope of fluorescence change is linearly dependent on the enzyme concentration and thus the enzymatic activity (Supplementary Fig. S5) and progress curves at different concentrations are linear below 25% conversion of the substrate. We used a completely converted assay solution (controlled by LC-MS) for the generation of appropriate calibration curves (Supplementary Fig. S7). Additionally, we were able to demonstrate that the novel activity assay is compatible with 96- and 384-well microtiter plate-based equipment yielding Z' -factors of 0.85 for **3** at 25 μM concentration (Equation S1). Kinetic constants determined with either HPLC based assay or with the novel assay performed in both MTP fluorescence readers or spectrophotometers yielded comparable results (Supplementary Tab. S2).

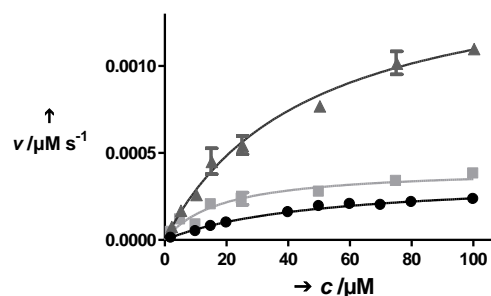


Figure 3. Kinetic characteristics of **3** for Sirt4 (●), Sirt5 (▲) and Sirt6 (■). The reactions were performed using 1 μM Sirt4 (MTP reader), 0.5 μM Sirt5 (HPLC) and 0.5 μM Sirt6 (HPLC), 500 μM NAD^+ and varying concentrations of **3**.

Caused by the relatively low k_{cat} -values of the known substrates, “classical” sirtuin activity assays are running between 30 and 120 min at enzyme concentrations between 0.5 and 4 μM to generate sufficient signal changes. These are conditions where the basic assumption of the Michaelis-Menten-equation $[E] \ll [S]$ is not valid. Moreover, the high amounts of enzyme prevent the correct determination of K_i -values for sirtuin inhibitors with affinities below half of the enzyme concentrations used. With our novel substrate **3** we were able to follow enzymatic activities down to 10 nM sirtuin concentration (Supplementary Fig. S6). We used 96-well MTP fluorescence reader for the determination of the K_i -values for different inhibitors (Fig. 4) shown in Table 3 including inhibitors with high affinities to sirtuin isoforms.

The first product of the sirtuin reaction, nicotinamide (NA), is known to be a non-competitive inhibitor with respect to both acylated peptide substrate and NAD^+ -cosubstrate by re-binding to the active site and attacking the sirtuin bound *O*-alkylimidate reforming NAD^+ . For Sirt6 an IC_{50} value of 2.2 mM was reported for NA indicating that this isoform is not influenced by physiological NA concentrations⁵¹.

We determined the K_i -values of NA for Sirt3 and Sirt6 to be 93 μM and 451 μM , respectively, using NAD^+ at saturating conditions, and to be 45 μM and 415 μM , respectively, using peptide substrate at saturating conditions. Ob-

viously, the K_i -value for NA is lower than expected for Sirt6, but still higher than for other isoforms. Recently, it was shown that the IC_{50} -values for NA are dependent on the chemical nature of the acyl moiety and that different sirtuin isoforms have different acyl-dependent susceptibilities to NA inhibition⁵⁰.

Table 2. Kinetic constants for **3** and Sirt1-6.

Enzyme	K_M [μ M]	$10^{-3}k_{cat}$ [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$M^{-1}s^{-1}$]	c (Sirt) [nM]
Sirt1	0.7 \pm 0.08	2.1 \pm 0.1	287 ^[a]	500
Sirt2	0.12 \pm 0.02	23.8 \pm 0.8	176 000 ^[a]	10
Sirt3	3.3 \pm 0.4	9.1 \pm 0.4	2 800 ^[a]	100
Sirt4	49.5 \pm 7.5	0.4 \pm 0.02	7 ^[a]	1000
Sirt5	46.1 \pm 7.2	3.2 \pm 0.2	69 ^[b]	500
Sirt6	23.5 \pm 4.9	0.9 \pm 0.1	39 ^[a]	500

[a] measured using fluorescence spectrophotometer, [b] measured using MTP fluorescence reader (see supporting information for details).

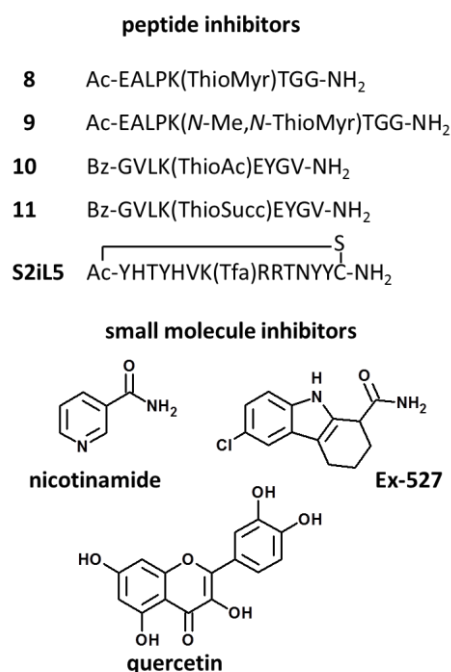


Figure 4. Structure of inhibitors.

Our substrate closely resembles the physiological myristoyl substrate, indicating that our value should reflect the sensitivity of this substrate modification. Recently, compounds Quercetin and Ex-527 were reported as Sirt6 inhibitors with inhibition of enzymatic activity of 52% and 56%, respectively, if used at 200 μ M concentration⁵¹. We determined K_i -values for these two small molecules and found considerable non-competitive inhibition with respect to the peptide substrate (Tab. 3). The cyclic peptide derivative S2iL5, containing a trifluoroacetylated lysine side chain as a warhead for inhibition of sirtuin catalysis⁵², was claimed to be a Sirt2 specific inhibitor with affinities to the active site in the low nanomolar range as determined by

isothermal calorimetry measurements⁵³. Using **3** as substrate the determined K_i -value is 560 nM and the cyclic inhibitor behaves non-competitive for the peptide substrate (Supplementary Fig. S13). Replacement of the amide bond formed by the acyl chain and the ϵ -amino function of the lysine side chain by a thioxo amide bond transforms substrates into extremely slow substrates/inhibitors by generation of stalled intermediate resembling sirtuin bi-substrate inhibitors⁵⁴⁻⁵⁶. Thioxo myristoylated and shortened derivatives of **1** were shown to be cell permeable inhibitors for Sirt6 with remarkable cross-reactivity to Sirt1-3 and reported IC_{50} values in the single digit μ M range²³. Because of the high sirtuin concentration used in this enzymatic assay (i.e. 1 μ M Sirt6) we wondered if these values are too high, not properly reflecting the K_i . We determined the K_i -values of **8** for sirtuins 2, 3, and 6 using substrate **3** and 96-well-based readout (Tab. 3) and determined much better affinities to the sirtuins especially for Sirt2 with K_i -value of 80 nM. We were able to determine such K_i -values because in our case the enzyme concentration was about 100 times lower as compared to the assay used in^{60b}. Additionally, Sirt3 showed high affinity to **8**. For both, Sirt2 und 3, we were not able to determine the K_i -values if we pre-incubate the enzymes at 10 nM with different concentrations of **8** in the presence of NAD⁺ for 30 min enabling formation of the “stalled” intermediate without competition with the substrate peptide.

Starting the reaction by addition of **3** we got complete inhibition down to low nanomolar concentrations of **8** demonstrating that the pre-formed bi-substrate inhibitor has affinities to Sirt2 and Sirt3 in the very low nanomolar or picomolar range. The resulting non-competitive inhibition against peptide substrate is in accordance with the suggested model of bi-substrate like inhibitors for thioxo acylated derivatives (Supplementary Fig. S11).

Identification of small molecule modulators of sirtuin activity using **3** could be hampered by absorbance/fluorescence of the effectors in the range between 320 nm and 400 nm. Consequently, the known sirtuin activity modulator resveratrol could not be analyzed because of the high extinction coefficient in that range. Therefore, we exchanged the 2-aminobenzoylamide fluorophore by (4-*N,N*-dimethylamino-1,8-naphthalimido)-acetamide resulting in derivative **6** with fluorescence excitation at 471 nm⁸⁸. Surprisingly, this fluorophore could be used in combination with the 3-nitro-*L*-tyrosine quencher despite non-optimal overlap of the spectra, and more surprisingly, this compound is not a substrate for sirtuins 1, 3, 5 and 6 as determined by HPLC-based assays and was a weak substrate for Sirt2 with an about 500-fold lower k_{cat}/K_M -value as compared to **3**. Interestingly, Sirt4 recognized **6** better than **3** resulting in an about 10-fold improved K_M -value (Supplementary Tab. S2) indicating that there are differences in the flexibility of the hydrophobic channel accommodating the acyl chain between Sirt4 and the other sirtuin isoforms. However, these results show that the development of substrates with different spectral properties is in principle possible with this approach, and that also the development of isoform-selective substrates should be possible by systematic variation of the size and position of the fluorophore in the acyl side chain.

Because of the obvious limitations for most of the sirtuins in accommodating bulkier fluorophores, we decided to create a small quencher moiety at this position closely related to the well recognized 2-amino-benzoylamide resi-

due. Addition of a nitro function in para-position to the amino-group of the 2-amino-benzoylamide moiety generates a very efficient quencher for more bulky fluorophores like 7-methoxy-coumaryl-L-alanines (Mca) or even (4-*N,N*-dimethylamino-1,8-naphthalimido)-L-alanines (Dma) (data not shown). We speculated that sirtuins are less sensitive for modifications within the peptide sequence and synthesized several derivatives of **1a** characterized by substitutions of residues in different positions relative to the myristoylated lysine by either Dma (**12**, **13**) or Mca (**15**, **16**). Additionally, we attached the fluorophores to the *N*-terminus in form of appropriately substituted acetyl residues (**14**, **17**). Analysis of sirtuin 2, 3, and 6 activity against these substrates using an HPLC-based assay revealed that all peptides are substrates but only **13** and **16** are well recognized (Supplementary Tab. S1). For solubility reasons (data not shown) we decided to combine the 7-methoxy-coumaryl-L-alanyl-residue with the 5-nitro-2-amino-benzoylamide quencher moiety resulting in **7**. The substrate properties of **7** for Sirt2 and Sirt4 are superior to substrates described in the literature and similar to **3**, demonstrating that fluorophore and quencher positions could be switched without influence on substrate properties (Supplementary Tab. S2 and Fig. 1).

Table 3. K_i -values for different inhibitors.

inhibitor	Enzyme	K_i (3) [μ M]	K_i (NAD ⁺) [μ M]
NAM	Sirt3	93.0 \pm 8.5	45.0 \pm 14.2
	Sirt6	451.0 \pm 60.7	415.0 \pm 45.1
Ex-527	Sirt6	100.0 \pm 11.0	n.d.
Quercetin	Sirt6	21.0 \pm 3.4	n.d.
S2iL5	Sirt2	0.6 \pm 0.2	n.d.
8	Sirt2	0.08 \pm 0.02	n.d.
	Sirt3	0.1 \pm 0.02	n.d.
	Sirt6	0.4 \pm 0.1	n.d.
	Sirt6 ^[a]	1.1 \pm 0.1 ^[e]	n.d.
	Sirt6 ^[b]	1.9 \pm 0.2 ^[e]	n.d.
9	Sirt6 ^[c]	0.6 \pm 0.1 ^[e]	n.d.
	Sirt6 ^[d]	1.7 \pm 0.5 ^[e]	n.d.
10	Sirt2	0.3 \pm 0.1	n.d.
11	Sirt2	50.0 \pm 9.9	n.d.

[a] 2.5 % *cis*-isomer, [b] 25 % *cis*-isomer, [c] 72.4 % *cis*-isomer, [d] 29.7 % *cis*-isomer, [e] IC₅₀ value, n.d. not determined

Our novel assay allows sophisticated enzymatic analyses that were not possible so far with the available, slow sirtuin assays. Inspection of the published crystal structure of Sirt6 in complex with the myristoylated H3K9 substrate (PDB ID 3ZG6) and the respective electron density maps revealed that both conformations of the amide bond between the fatty acid and the lysine side chain amino function could be fitted but the published coordinates are given in a conformation

resembling the *cis* conformation of peptide bonds⁸⁹. In the recently reported structures of Sirt2 complexed with a thioxo myristoylated inhibitor closely related to **8** (PDB ID 4Y6Q) or a thioxo myristoylated peptide derived from Histone H3 (PDB IDs 4Y6L and 4R8M) the conformation of the thioxo amide bond was in *trans* conformation⁹⁰ which is the preferred conformation of secondary amide/thioxo amide bonds in aqueous solutions. We synthesized **8** to analyze if there is any isomer-specificity during binding to the active site of Sirt2 and Sirt6. Normally, *cis/trans* isomerizations of secondary amide bonds are too fast compared to the time needed for “classical” sirtuin activity assays preventing such analyses. Our novel assay allowed enzymatic measurements within short time and the isomerization of thioxo amide bonds is relatively slow at lower temperatures⁹¹. Additionally, the UV-absorption of the π - π^* transition for the *cis* conformer of thioxo amide bond is slightly red-shifted enabling determination of *cis/trans* isomerization rates using UV-spectroscopy⁹². We determined the isomerization rate for **8**, **10** and **11** at different temperatures subsequent to increasing the *cis* content in the photo-excited state using UV-light (Supplementary Figs. S15-29).⁹²⁻⁹³ The re-equilibration to the ground state (nearly 100 % *trans*-conformation) could be followed using UV-spectroscopy at 260 nm yielding activation parameters (Supplementary Figs. S15-29). To analyze isomer-specific inhibition of Sirt2 by **8** we optimized the assay conditions to be able to measure the enzymatic activity using **3** without significant *cis/trans* isomerization during the assay. The *cis*-content of **8** is 2.5% in assay buffer and up to 25% in the photo-excited state as measured by HPLC (Supplementary Fig. S30). We determined the rate of re-equilibration for **8** to be able to calculate the resulting *cis*-content subsequent to different times of darkness (Supplementary Tab. S3). This setup enables the determination of inhibition of Sirt2 mediated deacylation of **3** at different *cis*-contents of **8** ranging from 2.5% to 25%. We found no significant difference in inhibitory effect depending on the *cis*-content of **8** indicating an unexpected plasticity of the active site of Sirt2 to accommodate both conformations with similar affinities. This result indicates that the Sirt2/myristoyl-peptide complexes, which were modeled as in *trans* conformation^{22,50} would also be compatible with *cis*. In the case of Sirt6 we determined IC₅₀-values of 1.06 \pm 0.12 μ M and 1.87 \pm 0.18 μ M for 2.5% and 25% *cis* isomer of **8**, respectively, pointing to a small preference for the *cis* conformation of the amide bond (Supplementary Fig. S32). Nevertheless, because of the suboptimal substrate properties of **3** for Sirt6 we needed 30 min for this activity assay which allows significant re-equilibration of the photo-induced change of the *cis/trans* equilibrium. Therefore, we introduced an additional methyl group at the lysine nitrogen resulting in a tertiary thioxo amide **9** which is an inhibitor with similar affinities to the active site of Sirt6 as compared to **8** (Supplementary Tab. S4). The *cis/trans* isomerization of the tertiary thioxo amide bond of **9** is with a rate constant of 5.4 \times 10⁻⁴ s⁻¹ at 20°C (Supplementary Fig. S31) much slower than that of the secondary thioxo amide bond of **8**. HPLC analyses revealed a *cis* content of about 50% and there was no change detectable subsequent to photo-excitation at the π - π^* transition of the tertiary thioxo amide bond. We tested several different organic solvents to change the *cis* content but found no sufficient differences (Supplementary Tab. S5).

Therefore, we decided to separate the two isomers by HPLC at low temperatures (4°C).

We were able to enrich the faster migrating *cis* isomer to 72.4% and the *trans* isomer to 70.3% (Fig. 5). The frozen isomers (-70°C) are stable for several days (Supplementary Fig. S35).

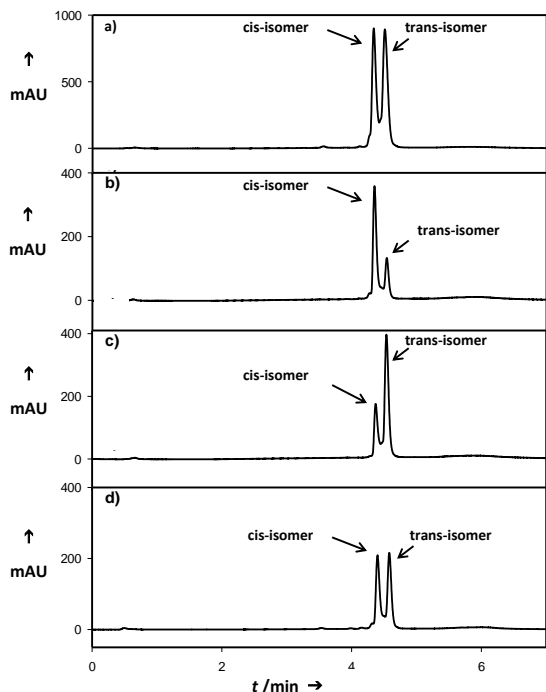


Figure 5. Enrichment of *cis* and *trans* isomers of **9** using HPLC. a) 50 mM solution of **9** equilibrated at RT for 24 h. b, c) Fractions collected by HPLC. d) Aliquot of fraction b) was equilibrated at 20 °C for 24 h.

Determination of inhibition of Sirt6 by **9** using samples with different *cis* content showed minimal preference for the *cis* isomer (IC₅₀ values of 0.6 μM and 1.7 μM for 72.4% and 29.7% of *cis* of **9**, (Supplementary Fig. S34). These results demonstrate again that there is some plasticity within the active site of sirtuins, at least for Sirt2 and Sirt6, enabling both isomers to bind with similar affinities. Inspection of the electron density maps of PDB 4R8M and 3ZG6 suggest that there is sufficient space around the lysine side chain amide/thioamide bond to fit both isomers. Recently, Sirt6 coordinates of 3ZG6 were re-refined by Denus lab and it was demonstrated that the myristoylated peptide should be in a *trans* conformation regarding the amide bond between the lysine side chain and the acyl moiety⁵⁰.

We presented here a novel direct and continuous sirtuin activity, which allows convenient measurement of highly accurate data. The sensitivity of the assay further enables for the first time the reliable determination of K_i-values for inhibitors with affinities below 100 nM. Because of the demonstrated compatibility with 384-well MTP readout it could be expected that this assay principle will find widespread use in drug discovery projects. Additionally, the superior substrate properties of **3** allow the investigation of isomer-specificity in the binding of inhibitors to the active site of sirtuins enlarging the portfolio of tools in sirtuin research.

Methods

Chemicals and general methods. All chemicals were purchased from Sigma (Saint Louis, USA) if not denoted otherwise. Rink amide MBHA resin was obtained from Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). 9-fluorenylmethoxy-carbonyl- (Fmoc) protected amino acid derivatives and *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Roth (Karlsruhe, Germany). For HPLC separations solvents consisting of water (solvent A) and ACN (solvent B), both containing 0.1% TFA, were used. Analytical runs were performed on an Agilent 1100 HPLC (Boeblingen, Germany) with a quaternary pump, a well-plate autosampler and a variable wavelength detector. Separations were performed on a 3.0 x 50 mm reversed phase column (Phenomenex Kinetex XB C-18, 2.6 μm) with a flow-rate of 0.6 mL/min. A Merck-Hitachi High Speed LC system (Darmstadt, Germany) with a Merck Hibar Li Chrospher RP-8 column (250-25 mm, 5 μm) was used for preparative separations (flow-rate: 8 mL/min). Eluted compounds were analyzed by MALDI mass spectrometry. NMR spectroscopy was carried out using Varian Gemini 2000 spectrometer in deuterated chloroform.

Synthesis of Fmoc-Lys(Nosyl)-OH (*N*-α-(9-Fluorenylmethyl-oxycarbonyl)-*N*-ε-(2-nitrobenzenesulfonyl)-L-lysine). The solution of L-lysine hydrochloride (20 mmol) and NaHCO₃ (20 mmol) in 20 mL of H₂O was combined with CuSO₄·5H₂O (10 mmol) solution in 40 mL of H₂O. The vigorously stirred purple solution was cooled with ice bath and a solution of 2-nitrobenzenesulfonyl chloride (30 mmol) in acetone (60 mL) was added. Next solid NaHCO₃ (75 mmol) was added in portions over 1 hour. The stirred reaction mixture was left in melting ice bath overnight. The blue precipitate was filtered, washed subsequently with H₂O, ethanol and diethyl ether (Et₂O). After air drying yield of the complex was 87%. To the copper complex of ε-nosyl lysine (5 mmol) a solution of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt (6.5 mmol) in 40 mL of H₂O was added. This suspension was stirred and heated at 70-80 °C until no blue complex was left and then cooled to room temperature. Afterwards solid NaHCO₃ (10.5 mmol) was added to the formed suspension of ε-nosyl lysine and followed by solution of Fmoc-*N*-hydroxysuccinimide ester (Fmoc-OSu) (10.5 mmol) in 30 mL of acetone. The mixture was stirred vigorously overnight, diluted with 250 mL of 1% solution of NaHCO₃ and extracted with Et₂O (3 × 100 mL). Ether washings were back extracted with diluted NaHCO₃ solution and discarded. Combined water phases were acidified with 10% HCl and extracted with dichloromethane (DCM) (3×50 mL). Combined organic layers were washed with water and dried over Na₂SO₄. Solvent was evaporated to afford target compound as white foam. Yield: 91%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8.15 – 8.06 (m, 1H), 7.85 – 7.78 (m, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.71 – 7.63 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 5.48 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.48 – 4.29 (m, 3H), 4.21 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.16 – 3.0 (m, 2H), 1.94 – 1.34 (m, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 176.0, 156.1, 148.0, 143.8, 143.7, 141.3, 133.5, 132.7, 131.0, 127.7, 127.1, 125.3, 125.1, 120.0, 67.2, 53.3, 47.1, 43.3, 31.6, 28.9, 21.9.

Synthesis of carboxymethyl dithiomyristoate. Carboxymethyl dithioester was prepared in analogy with Leon *et al*⁶¹. To the solution of myristic acid (4 mmol), HBTU (4 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (8 mmol) in DCM (30 mL) was added piperidine (4.2 mmol). After 4 hours reaction mixture was

diluted with water and extracted with DCM. Extracts were washed with diluted HCl, diluted NaHCO₃ and with water, dried over Na₂SO₄ and DCM was evaporated. To the residue toluene (10 mL) was added followed by Lawesson's reagent (2 mmol). Reaction was heated at 106 °C for 3.5 hours. Solvent was evaporated and residue flash-chromatographed (silica gel, ethyl acetate (EtOAc)/petr.ether 1:9) (Yield: 74%).

The solution of N-thiomyrystoyl piperidine (3 mmol) and bromoacetic acid (3.2 mmol) in 7 mL of dried DMF was left at room temperature overnight. Solution was saturated with dry H₂S for 30 min and DMF was evaporated in vacuo. Flash-chromatography of the residue (silica gel, DCM/AcOH 10:0.05) afforded the pure product as a yellow solid (Yield: 25%).

Synthesis of methyl 3-[(methylthio)thiocarbonyl]propanoate.

Solution of succinic anhydride (50 mmol) and piperidine (50 mmol) in EtOAc (10 mL) was refluxed for 10 min. Next day precipitated product was filtered, washed with EtOAc and air dried (Yield: 90%).

N,N-pentamethylenesuccinamic acid (10 mmol) was refluxed in anhydrous MeOH (15 mL) containing 2 drops of H₂SO₄ for 4 hours. Solvent was evaporated and residual oil dissolved in EtOAc, washed with NaHCO₃ solution, water and dried over Na₂SO₄. Evaporation of EtOAc afforded product as a colorless oil (Yield: 84%).

Methyl N,N-pentamethylenesuccinamate (8.4 mmol) and Lawesson's reagent (5.1 mmol) were refluxed in tetrahydrofuran (THF) (10 mL) for 1 hour. THF was evaporated in vacuum and the residue was flash-chromatographed (silica gel, EtOAc/petr.ether 1:5). Yield of slightly yellowish oil 86%.

To a solution of Methyl 3-(N,N-pentamethylenethiocarbonyl)propanoate (2 mmol) in anhydrous THF (8 mL) was added MeI (10 mmol). Reaction mixture was left for 2 days in the dark. Yellow-colored THF was decanted, the crystals were briefly washed with dry THF and dissolved in dried DMF (3 mL). Dried H₂S was bubbled into solution for 2 h and mixture was left at 0 °C for one day. After addition of H₂O (100 mL), product was extracted with EtOAc, washed several times with water, brine and dried over Na₂SO₄. Evaporation of EtOAc in vacuo gave the crude product as a yellow oil (Yield: 81.5%).

Synthesis of TNF α peptide derivatives. The peptide Ac-EALPKK(NS)XGG-NH₂ (X = T, Y(NO₂) or Mcm) was synthesized by standard manual solid-phase-peptide synthesis using Fmoc-protected amino acid derivatives. Rink amide MBHA resin was treated with N,N-dimethylformamide (DMF) at room temperature (RT) for 10 min. The Fmoc-protecting group was removed with 20% piperidine in DMF (2×10 min). After washing with DMF (5×5 min) the resin was incubated with 4 eq of amino acid derivative, 4 eq HBTU and 8 eq of N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) in DMF at RT (60 min). The N-terminus was modified with 4 eq acetic anhydride and 8 eq DIPEA in DCM (60 min). Nosyl-group was cleaved using 5 eq 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) and 5 eq thiophenol in DMF (2×90 min). Afterwards the resin was washed with DMF. Free lysine side chain was modified on-resin with HBTU (4 eq.), DIPEA (8 eq.) in DCM/DMF mixture (1:1) and myristic acid (**1a**, **2a**), 6-(Fmoc-amino)-caproic acid and N-Boc-anthranilic acid (**4**, **5**) or 8-(Fmoc-amino)-octanoic acid and N-Boc-anthranilic acid (**4a**). For **3** free lysine residue was acylated with 11-azidoundecanoic acid⁹⁴ by the method used for peptides **1a** and **1b**. The resin was treated with a solution of triphenylphosphine (5 eq) in tetrahydrofuran (THF)/H₂O (95:5) for several days (small portions of resin were taken for the test cleavage and MS-analysis). After washing N-Boc-anthranilic acid was coupled by the standard meth-

od (see peptides **1a** and **2b**). **6** and **7** were prepared like peptide **3** with (4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimid)-acetic acid⁸⁸ (**6**) or 2-amino-5-nitrobenzoic acid (**7**) instead of N-Boc-anthranilic acid. For **8** the resin bound peptide was incubated with the solution of carboxymethyl dithiomyrystoate (3 eq) and DIPEA (3 eq) in DMF for 3 h and cleaved as described in general procedure. For **9** an ice-cooling prepared solution of 5 eq. of triphenylphosphine, 5 eq. of diethyl azodicarboxylate (DIAD) and 10 eq. of dried MeOH in dried DCM was added to the resin-bound fully protected peptide with the ϵ -Nosyl-protected lysine (Mitsunobu reaction). After one hour of incubation the resin was washed 5 times with DMF. Nosyl-group was removed as described above and resin was treated with a solution of carboxymethyl dithiomyrystoate (3 eq) and DIPEA (3 eq) in DMF for 3h.

Peptides **10** and **11** are based on a CPS1-peptide (Bz-GVLKEYGV-NH₂). To a DMF solution of the CPS1 peptide ethyl dithioacetate (1.2 eq) and triethylamine (5 eq) (**10**) or methyl 3-[(methylthio)thiocarbonyl]propanoate (1.1 eq) and triethylamine (5 eq) (**11**) were added. Reaction mixture was stirred for 3-5 h. For **11** 1 M NaOH (6 eq) was added and stirring continued for another 2 h. The cyclic peptide inhibitor S2iL5 was synthesized by standard Fmoc-based solid phase peptide synthesis as described by Yamagata et al.⁵³.

All 3-nitrotyrosine containing peptides (**2a**, **2b**, **3**, **4**, **4a**, **5** and **6**) require an additional piperidine treatment step (20% piperidine in DMF, 2×10 min) to remove acyl-group from 3-nitrotyrosine before cleavage.

The resin was washed with DCM (5×4 min), methanol (3×4 min) and DCM again and treated with TFA/H₂O (98:2) (2×60 min). Combined TFA solutions were evaporated in vacuum and re-dissolved in ACN/H₂O solution (50:50). HPLC purification and subsequent lyophilization yielded pure peptides.

Expression and purification of human sirtuins. Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt5 and Sirt6 were expressed and purified as described before.^{24,45,63,64}

To obtain the expression plasmid of human (His)₆-SUMO-Sirt4(29-314), the respective DNA fragment was PCR-amplified using gene-specific primers from the plasmid pET101-Sirt4, which carries the Sirt4 gene, and cloned into the BsaI, XbaI sites of pE-SUMO yielding the plasmid pE-SUMO-Sirt4(29-314).

The protein was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells at 18 °C. The purification of the protein was performed using affinity chromatography on Ni-NTA resin in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl. The matrix-bound (His)₆-SUMO-Sirt4(29-314) was eluted by imidazole in the buffer and further purified by gel filtration in 10 mM HEPES, pH 7.8, 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and stored at -20 °C for use.

pQE-80L (Qiagen, Valencia, Ca) His-tagged Sirt6 (1-355) was transformed into the competent *E. coli* strain, BL21 DE3 and overexpressed at room temperature. For purification a nickel resin affinity chromatography was used in 50 mM NaP_i pH 7.2, 250 mM NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM BME and eluted by 250 mM imidazol in the buffer. Furthermore, Sirt6 was purified secondarily via a HiTrap SP-Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) using a linear gradient from 50-750 mM NaCl in 50 mM NaP_i pH 7.2, 1 mM BME. Afterwards fractions containing purified Sirt6 were pooled, concentrated and dialyzed into 50 mM Tris, pH 8.0 (4 °C), 150 mM NaCl, 100 μ M TCEP and 5% (w/v) glycerol and stored at -70 °C.

HPLC based activity assay. For determination of kinetic constants for all sirtuin mediated reactions solutions containing 20 mM TRIS/HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (assay-buffer),

500 μM NAD^+ and varying substrate concentrations (0.5-100 μM) were used. Deacylation was started by adding human sirtuin to reach a final concentration of 0.01-0.5 μM . Enzyme-catalyzed reaction was stopped using TFA (1% final concentration) after 1 to 180 min of incubation at 37°C depending on substrate reactivity. The cleavage rate of the different TNF α peptide derivatives was analyzed using analytical reversed phase HPLC. 40 to 80 μl of compounds or reaction solutions were injected and separated using a linear gradient from 5 % to 95 % solvent B within 6min. The product and substrate peaks were quantified using absorbance at 220 nm or 365 nm (absorption of 3-Nitrotyrosyl moiety). The peak areas were integrated and converted to initial velocity rates calculated from the ratio of product area to total peak area. Linear regression of conversions plotted against time yielded reaction rates in $\mu\text{M}/\text{min}$ (relative conversion below 20% of substrate). Non-linear regression according to Michaelis-Menten of the reaction rates at different substrate concentrations yielded K_M - and k_{cat} -values using the program SigmaPlot 8 (Systat Software, San Jose, USA). All measurements were done in duplicates.

Direct continuous fluorescence assay. The fluorescence measurements were performed on a Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer (Tokyo, Japan) at $\lambda_{\text{ex}}=310$ nm and $\lambda_{\text{em}}=405$ nm (slit $_{\text{ex}}=5$ nm, slit $_{\text{em}}=2.5$ nm, PMT=700 V for **3**, **4** and **5** as well as slit $_{\text{ex}}=10$ nm, slit $_{\text{em}}=10$ nm, PMT=950 V for **4a**). Each reaction mixture contained assay-buffer, 0.5 mM NAD^+ and various peptide concentrations (0.1-100 μM) and was preincubated for 5 minutes at 37°C. The reaction was started by adding human sirtuin (0.1-0.5 μM) and observed for 5-10 minutes. Product formation could be monitored by increase of relative fluorescence. This signal was converted into product concentration via calibration lines. The slope of the linear regression of product formation against time yielded the reaction velocity rates in $\mu\text{M}/\text{s}$. K_M and k_{cat} were obtained by non-linear regression according to Michaelis-Menten. All measurements were done in duplicates. For determination of reaction velocity rates in $\mu\text{M}/\text{s}$ calibration lines were necessary. Therefore a reaction mixture was prepared, containing assay-buffer, 2 μM Sirt2, 500 μM NAD^+ and 100 μM of **3**, **4**, **4a** or **5** was incubated overnight at 37 °C. The reaction mixture was analyzed with HPLC, to control if the entire peptide substrate was turned to product. Additionally the mixture was diluted (0.1-25 μM) and measured with Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer at the same conditions as described above. The microtiter plate fluorescence measurements were performed on a Tecan Infinite M200 microplate reader (Maennedorf, Switzerland) at $\lambda_{\text{ex}}=320$ nm and $\lambda_{\text{em}}=408$ nm (lag time 9 μs , integration time 20 μM , gain 160, 170 or 182). The reaction solution contained assay-buffer, 500 μM NAD^+ and 0.07-200 μM peptide substrate and was pre-incubated at 37°C. The reaction was started by adding human sirtuin (0.01-0.5 μM). The signals were converted into product concentration via calibration lines and the resulting data were evaluated like described above (single fluorescence measurement). The determination for the kinetic constants of NAD^+ was performed in the same way, except that the peptide concentration was fixed (5, 25 or 200 μM) and the NAD^+ concentration was varied (10-1500 μM). All measurements were done in duplicates. The reaction mixture for the calibration lines was prepared as described for the single fluorescence measurements. After entire turnover of peptide substrate **3**, the solution was diluted (0.2-20 μM) and measured on Tecan infinite M200 microplate reader at $\lambda_{\text{ex}}=320$ nm and $\lambda_{\text{em}}=408$ nm (lag time 9 μs , integration time 20 μM , gain 182 (G182), 170 (G170) and 160 (G160)). K_i values of the inhibitors were determined recording k_{cat} and K_M values for **3** in the presence of varying inhibitor concentrations

(0.01-600 μM). The resulting plots were analyzed by a competitive inhibition and non-competitive inhibition model using the program Sigma Plot 8. The linear regression of the apparent K_M -values against the corresponding inhibitor concentration yielded the inhibitor constant K_i for competitive inhibition. The K_i for non-competitive inhibition was determined by linear regression of $1/\text{apparent } V_{\text{max}}$ against the corresponding inhibitor concentration. The negative K_i value can be determined as intersection with the X-axis from these plots.

Z' factor analysis. The Z' factor is a dimensionless, simple statistic parameter for high-throughput screening assays.⁶⁵ It is defined as the ratio of separation band to signal dynamic range of the assay and used the signal variation at the two extremes of the activity range (0 and 100% activity). $Z' = 1 - ((3 \cdot \text{SD}_{100\%} + 3 \cdot \text{SD}_{0\%}) / (\text{mean}_{100\%} - \text{mean}_{0\%}))$ (Equation 1). By using substrate **3** at 25 μM a Z' factor of 0.85 was determined indicating that the assay is excellent.

Photo-induced change of cis-content of thioxo peptides. Excitation experiments of thioxo peptides were done in a cuvette at 254 nm under stirring with a UV-lamp (UV handheld lamp, Carl Roth). For irradiation a distance of 5 cm between cuvette and UV-lamp was chosen. UV-spectra were recorded between 230 and 325 nm using a spectrophotometer (Specord M500).

For determination of temperature dependent *cis/trans* isomerization a 50 μM solution of thioxo peptide was incubated for 10 min at different temperatures (10-70°C). UV-spectra were recorded at ground state (GS) and after irradiation at 254 nm (irradiation time 45 s to 5 min) at photostationary state (PSS). Several UV-spectra over time were recorded to determine rates of *cis/trans* isomerization. Using a differential spectrum (UV spectrum GS – UV spectrum PSS) activation parameter and isomerization velocity could be examined.

The *cis/trans* content of a 50 μM thioxo peptide solution was changed by 5 min irradiation at 254 nm and the resulting solution was analysed by HPLC. Additionally, several solvents were tested to enhance *cis* content. As solvents H_2O , acetic acid, TFA, trifluoro ethanol (TFE), 0.5 LiCl in $\text{H}_2\text{O}/\text{ethanol}$ (EtOH)/TFE, methanol (MeOH), formic acid, *N*-methyl pyrrolidone (NMP), DMF, Dimethylsulfoxid (DMSO) and tetrahydrofuran (THF) were chosen. *Cis* content was determined via HPLC of a 500 μM solution of **9**. For the separation of isomers 5-6 mg of **9** were dissolved in 50% ACN and equilibrated overnight. For better separation HPLC-solvents were cooled down to 4 °C and a linear gradient of 45% solvent B to 55% solvent B in 70 min was used. Eluted fractions were immediately frozen in liquid nitrogen. HPLC-based determination of *cis* content was done directly after preparative separation. The examination of the isomer specific inhibition of **8**, **9**, **10** and **11** was examined via HPLC using reaction solutions composed of 500 μM NAD^+ , 30 μM peptide, 0.5 μM sirtuin and 0.5-40 μM inhibitor in GS, PSS or GS* in assay buffer. After 30 min incubation at 20 °C reaction was stopped using 10% TFA solution. Inhibitor solutions were irradiated at 254 nm for 5 min. Separated isomers were applied in concentrations from 1 to 10 μM . The influence of *cis*-content on sirtuin inhibition using fluorescence spectrometer was determined with 500 μM NAD^+ , 5 μM **3**, 0.1 μM Sirt2 and 0.1 μM **9**. Reactions were done at 20 °C with **9** in GS and PSS (after 5 min irradiation at 254 nm). **9** in PSS was applied immediately after irradiation (transfer time ~5 s) and started directly by adding sirtuin. Reactions were measured within 1 min to avoid re-isomerization.

References

1. Choudhary, C., Weinert, B.T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabo-

- lism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 536-550 (2014).
2. Zhao, S. et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327, 1000-1004 (2010).
 3. Chen, Y. et al. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics* 6, 812-819 (2007).
 4. Garrity, J., Gardner, J.G., Hawse, W., Wolberger, C. & Escalante-Semerena, J.C. N-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 282, 30239-30245 (2007).
 5. Zhang, Z. et al. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat Chem Biol* 7, 58-63 (2011).
 6. Xie, Z. et al. Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol Cell Proteomics* 11, 100-107 (2012).
 7. Peng, C. et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol Cell Proteomics* 10, M111 012658 (2011).
 8. Tan, M. et al. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab* 19, 605-617 (2014).
 9. Tan, M. et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016-1028 (2011).
 10. Dai, L. et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nat Chem Biol* 10, 365-370 (2014).
 11. Moellering, R.E. & Cravatt, B.F. Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite. *Science* 341, 549-553 (2013).
 12. Stevenson, F.T., Bursten, S.L., Fanton, C., Locksley, R.M. & Lovett, D.H. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7245-7249 (1993).
 13. Wagner, G.R. & Payne, R.M. Widespread and enzyme-independent Nepsilon-acetylation and Nepsilon-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 288, 29036-29045 (2013).
 14. Weinert, B.T. et al. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol Cell* 51, 265-272 (2013).
 15. Kuhn, M.L. et al. Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation. *PLoS One* 9, e94816 (2014).
 16. Du, J. et al. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* 334, 806-809 (2011).
 17. Park, J. et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell* 50, 919-930 (2013).
 18. Feldman, J.L., Baeza, J. & Denu, J.M. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacetylation by mammalian sirtuins. *J Biol Chem* 288, 31350-31356 (2013).
 19. Jiang, H. et al. SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* 496, 110-113 (2013).
 20. Mathias, R.A. et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* 159, 1615-1625 (2014).
 21. Bao, X. et al. Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *Elife* 3 (2014).
 22. Teng, Y.B. et al. Efficient demyristoylase activity of SIRT2 revealed by kinetic and structural studies. *Sci Rep* 5, 8529 (2015).
 23. He, B., Hu, J., Zhang, X. & Lin, H. Thiomyristoyl peptides as cell-permeable Sirt6 inhibitors. *Org Biomol Chem* 12, 7498-7502 (2014).
 24. Moniot, S., Schutkowski, M. & Steegborn, C. Crystal structure analysis of human Sirt2 and its ADP-ribose complex. *J Struct Biol* 182, 136-143 (2013).
 25. Haigis, M.C. & Guarente, L.P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20, 2913-2921 (2006).
 26. Schutkowski, M., Fischer, F., Roessler, C. & Steegborn, C. New assays and approaches for discovery and design of Sirtuin modulators. *Expert Opin Drug Discov* 9, 183-199 (2014).
 27. Fan, Y. & Scriba, G.K. Electrophoretically mediated microanalysis assay for sirtuin enzymes. *Electrophoresis* 31, 3874-3880 (2010).
 28. Tanner, K.G., Landry, J., Sternglanz, R. & Denu, J.M. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14178-14182 (2000).
 29. Roessler, C. 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* 53, 10728-10732 (2014).
 30. Marcotte, P.A. et al. Fluorescence assay of SIRT protein deacetylases using an acetylated peptide substrate and a secondary trypsin reaction. *Anal Biochem* 332, 90-99 (2004).
 31. Hubbard, B.P. et al. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* 339, 1216-1219 (2013).
 32. Smith, B.C., Hallows, W.C. & Denu, J.M. A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Anal Biochem* 394, 101-109 (2009).
 33. Wolfson, N.A., Pitcairn, C.A., Sullivan, E.D., Joseph, C.G. & Fierke, C.A. An enzyme-coupled assay measuring acetate production for profiling histone deacetylase specificity. *Anal Biochem* 456, 61-69 (2014).
 34. Wegener, D., Wirsching, F., Riestler, D. & Schwienhorst, A. A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chem Biol* 10, 61-68 (2003).
 35. Baba, R., Hori, Y., Mizukami, S. & Kikuchi, K. Development of a fluorogenic probe with a transesterification switch for detection of histone deacetylase activity. *J Am Chem Soc* 134, 14310-14313 (2012).
 36. Minoshima, M., Matsumoto, T. & Kikuchi, K. Development of a fluorogenic probe based on a DNA staining dye for continuous monitoring of the histone deacetylase reaction. *Anal Chem* 86, 7925-7930 (2014).
 37. Dhara, K., Hori, Y., Baba, R. & Kikuchi, K. A fluorescent probe for detection of histone deacetylase activity based on aggregation-induced emission. *Chem Commun (Camb)* 48, 11534-11536 (2012).
 38. Wang, Y., Chen, Y., Wang, H., Cheng, Y. & Zhao, X. Specific Turn-On Fluorescent Probe with Aggregation-Induced Emission Characteristics for SIRT1 Modulator Screening and Living-Cell Imaging. *Anal Chem* (2015).
 39. Liu, Y., Gerber, R., Wu, J., Tsuruda, T. & McCarter, J.D. High-throughput assays for sirtuin enzymes: a microfluidic mobility shift assay and a bioluminescence assay. *Anal Biochem* 378, 53-59 (2008).
 40. Suenkel, B., Fischer, F. & Steegborn, C. Inhibition of the human deacetylase Sirtuin 5 by the indole GW5074. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 143-146 (2013).

41. Hubbard, B.P. & Sinclair, D.A. Measurement of sirtuin enzyme activity using a substrate-agnostic fluorometric nicotinamide assay. *Methods Mol Biol* 1077, 167-177 (2013).
42. Howitz, K.T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196 (2003).
43. Madsen, A.S. & Olsen, C.A. Substrates for efficient fluorometric screening employing the NAD-dependent sirtuin 5 lysine deacetylase (KDAC) enzyme. *J Med Chem* 55, 5582-5590 (2012).
44. Hu, J., He, B., Bhargava, S. & Lin, H. A fluorogenic assay for screening Sirt6 modulators. *Org Biomol Chem* 11, 5213-5216 (2013).
45. Gertz, M. et al. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One* 7, e49761 (2012).
46. Kaeberlein, M. et al. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem* 280, 17038-17045 (2005).
47. Pacholec, M. et al. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285, 8340-8351 (2010).
48. Li, Y., Huang, W., You, L., Xie, T. & He, B. A FRET-based assay for screening SIRT5 specific modulators. *Bioorg Med Chem Lett* 25, 1671-1674 (2015).
49. Li, Y. et al. A FRET-based assay for screening SIRT6 modulators. *Eur J Med Chem* 96, 245-249 (2015).
50. Feldman, J.L. et al. Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacetylation. *Biochemistry* (2015).
51. Kokkonen, P. et al. Studying SIRT6 regulation using H3K56 based substrate and small molecules. *Eur J Pharm Sci* 63, 71-76 (2014).
52. Smith, B.C. & Denu, J.M. Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases. *J Biol Chem* 282, 37256-37265 (2007).
53. Yamagata, K. et al. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure* 22, 345-352 (2014).
54. Fatkins, D.G., Monnot, A.D. & Zheng, W. Nepsilon-thioacetyl-lysine: a multi-facet functional probe for enzymatic protein lysine Nepsilon-deacetylation. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 3651-3656 (2006).
55. Smith, B.C. & Denu, J.M. Mechanism-based inhibition of Sir2 deacetylases by thioacetyl-lysine peptide. *Biochemistry* 46, 14478-14486 (2007).
56. Fatkins, D.G. & Zheng, W. Substituting N(epsilon)-thioacetyl-lysine for N(epsilon)-acetyl-lysine in peptide substrates as a general approach to inhibiting human NAD(+)-dependent protein deacetylases. *Int J Mol Sci* 9, 1-11 (2008).
57. Loving, G. & Imperiali, B. A versatile amino acid analogue of the solvatochromic fluorophore 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimide: a powerful tool for the study of dynamic protein interactions. *J Am Chem Soc* 130, 13630-13638 (2008).
58. Zhao, J., Micheau, J.C., Vargas, C. & Schiene-Fischer, C. cis/trans photoisomerization of secondary thiopeptide bonds. *Chemistry* 10, 6093-6101 (2004).
59. Wildemann, D. et al. A nearly isosteric photosensitive amide-backbone substitution allows enzyme activity switching in ribonuclease s. *J Am Chem Soc* 129, 4910-4918 (2007).
60. Frank, R., Jakob, M., Thuncke, F., Fischer, G. & Schutkowski, M. Thioxylation as One-Atom-Substitution Generates a Photoswitchable Element within the Peptide Backbone. *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 1120-1122 (2000).
61. Leon, N.H. New compounds: synthesis of carboxymethyl carbodithioates. *J Pharm Sci* 65, 146-148 (1976).
62. Gubbens, J. et al. Photocrosslinking and click chemistry enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chem Biol* 16, 3-14 (2009).
63. Schlicker, C., Boanca, G., Lakshminarasimhan, M. & Steegborn, C. Structure-based development of novel sirtuin inhibitors. *Aging (Albany NY)* 3, 852-872 (2011).
64. Ryu, D. et al. A SIRT7-dependent acetylation switch of GABP-beta1 controls mitochondrial function. *Cell Metab* 20, 856-869 (2014).
65. Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4, 67-73 (1999).

Acknowledgements

We would like to thank the proteomics facility of the Martin-Luther University Halle-Wittenberg, especially Dr. Angelika Schierhorn and Christina Gersching, for recording of the mass spectra. We thank Norbert Grillenbeck and Barbara Korge for technical assistance. This study was funded by the BMBF research grant ProNet-T3.

Author contributions

M.S., S.S. and C.R. designed the assay and wrote the manuscript. S.S., C.R. and M.M. wrote supplementary information. S.S., M.M. and P.Z. synthesized peptides. S.S. and C.R. performed kinetic analysis with HPLC-based assay. S.S. and Z.S. performed kinetic measurements with direct fluorescence assay. P.Z. and C.R. performed photo-induced cis/trans-isomerization of thioxo peptides. P.Z. and C.R. expressed and purified Sirt5, C.K. and C.S. Sirt1, Sirt2, Sirt3 and Sirt6. C.S.-F. performed expression and purification of Sirt4 and M.O.H. of Sirt7.

Competing financial interest

The authors declare no competing financial interest.

Teil 5. Diskussion

Sirtuine sind interessante Untersuchungsobjekte, da sie eine zentrale Rolle bei der Regulation der Aktivität metabolischer Enzyme, von Transkriptionsfaktoren oder Proteinen des DNA-Reparatursystems spielen. Zudem bietet die Entwicklung von Sirtuin-Effektoren eine Möglichkeit neue Medikamente für Erkrankungen, wie Diabetes oder Krebs, zu entwickeln.

Erschwert wird die Erforschung neuer Sirtuin-Substrate und -Effektoren durch deren geringe katalytische Effizienzen, die im Vergleich zu Enzymen, wie Katalase oder Proteasen ($10^6 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁹⁵, nur im Bereich von $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegen (Anhang Tab. A1).

Einige Sirtuin-Isoformen, wie Sirt4 und Sirt7, konnten aufgrund ihrer noch geringeren Deacetylase-Aktivität ($<10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) nicht charakterisiert werden. Zudem ist wenig über deren Acylspezifität bekannt, die für die Sirtuin-Aktivität, wie für Sirt5 und Sirt6 gezeigt werden konnte, von entscheidender Bedeutung ist.^{20-21, 90a}

Die Analyse neuer Substrate erfolgt oft über den *knockdown* einzelner Sirtuin-Isoformen und die Analyse des Acetylierungsstatus oder über die Erforschung neuer *in vivo* PTMs über massenspektrometrische Proteomanalysen und die anschließende Überprüfung der Abspaltung dieses PTM durch HADCs oder Sirtuine. Einige neue PTM sind in den letzten Jahren entdeckt wurden und es kann vermutet werden, dass noch viele PTM unentdeckt sind, welche Acylsubstrate für Sirtuine sein könnten.

Eine andere Herangehensweise ist die Verwendung von Peptid-Mikroarrays und die anschließende *in vitro* Analyse der Acylspezifität. Mit Hilfe von Peptid-Mikroarrays, welche alle bekannten Acetylierungsstellen des humanen Proteoms darstellen, konnten RAUH *et al.* neue Substratproteine / -peptide für alle humanen Sirtuin-Isoformen identifizieren, welche in Lösung als Substrate bestätigt werden konnten.¹⁸ Zudem war es möglich bevorzugte Deacetylierungsstellen innerhalb eines Substratproteins näher zu spezifizieren. Für das Sirt5-Substrat CPS1 konnte Lys₅₂₇ als Deacetylierungsstelle nachgewiesen werden. Dieses CPS1-Peptid diente als Modellpeptid für die systematische *in vitro* Analyse der Acylspezifität von Sirt5. Die systematische Modifikation der ϵ -Aminogruppe des zentralen Lysins zeigte eine Sirt5-Acylspezifität für Glutarsäureamid. Diese Modifikation würde kürzlich als *in vivo* PTM nachgewiesen und konnte als *in vivo* Substrat für Sirt5 bestätigt werden.⁸ Die katalytische Effizienz des glutarylierten CPS1-Derivates ist dabei bis 35-fach höher als die veröffentlichten Daten (Anhang Tab. A1). Kristallstrukturanalysen und *molecular docking* Experimente offenbarten, dass die Interaktion des Dicarbonsäurerestes mit den Aminosäuren Arg₁₀₅ und Tyr₁₀₂ für eine korrekte Orientierung des Acylrestes im aktiven Zentrum sorgt und erhöht die Aktivität erhöht (Artikel 2.4.). Dies zeigt, dass die Kombination verschiedener *in vitro* Techniken neue Sirtuinsubstrate, vom geeigneten Peptidgrundgerüst bis hin zum spezifischen Acylrest, mit verbesserten katalytischen Konstanten, hervorbringen kann. Zudem ergab die Un-

tersuchung verschiedener substituierter Succinyl- und Glutaryl-Derivate ein hohes Substratspektrum für Sirt5, welches auf eine Flexibilität der Acyl-Lys-Bindestelle schließen lässt. Bestätigt wurde diese Flexibilität durch FELDMAN et al., die nachweisen konnten, dass die Abspaltung langkettiger Fettsäurereste nicht nur auf Sirt6 beschränkt ist, sondern auch von Sirt1 – Sirt5 katalysiert werden kann.²¹ Diese Tatsache machte es möglich ein nahezu universelles Sirtuinsubstrat zu entwickeln, welches den Fluorophor an einem Linker als Lysin-Modifikation trägt. Das intern Fluoreszenz-gequenchtete Peptid kann in einem direkten kontinuierlichen Messverfahren eingesetzt werden. Bisher wiesen FRET- oder intern Fluoreszenz-gequenchte Peptide sehr schlechte katalytische Effizienzen auf, welche wahrscheinlich auch auf die großen Chromophore (6-TAMRA oder Dabyl), zurückgeführt werden können. Die Einführung eines kleinen Fluorophor-Quencher-Paares (2-Abz, Y(NO₂)) weist deutlich verbesserte Substrateigenschaften auf (Manuskript 4.2.2.), welche die katalytische Effizienz für Sirt2 bis auf $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhöht. Das direkte ungekoppelte Messverfahren ist zudem bisher einzigartig und bietet den Vorteil, dass sich alle Messeffekte direkt auf die Sirtuinreaktion zurückführen lassen und zusätzliche Kontrollen, wie der Einfluss potentieller Effektoren auf Hilfsenzyme oder die Spaltung von Sirtuinen durch Proteasen, entfallen.

Eine andere Möglichkeit effiziente intern Fluoreszenz-gequenchte Peptide zu entwickeln ist ein sehr gutes Substrat, wie Bz-GVKL(Succ)EYGV-NH₂ (Artikel 2.4.) durch kleine Änderungen in Fluoreszenz-Substrat umzuwandeln. Durch die Einführung einer Aminogruppe an das N-terminale Benzoyl und eine Nitrogruppe an das Tyrosin entstand ein intern gequenchtetes Fluoreszenz-Substrat, das in einem Protease-gekoppelten Messverfahren für Sirt5 angewendet werden kann. Mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ist dieses Peptid für Sirt5 das beste bisher Gemessene (siehe Anhang Tab. A1).

Interessant sind neben den sehr guten katalytischen Konstanten der Peptide (Artikel 2.4, Manuskript 4.2.1., Manuskript 4.2.2) auch die niedrigen NAD⁺-K_M-Werte. Publierte Werte liegen im Bereich von 80-900 μM, gemessen meist für Sirt1.⁹⁶ Daher wurde vermutet, dass Sirtuine über den Energiestatus der Zelle, welcher direkt mit der NAD⁺-Konzentration zusammenhängt, reguliert werden, und damit metabolische Sensoren sind.⁹⁷ Da das NAD⁺-Level der Zelle im Bereich von 300-400 μM liegt, würde ein K_M-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich bedeuten, dass sich die NAD⁺-Konzentration nicht limitierend auf die Sirtuin-Aktivität auswirken kann. Dies lässt die Vermutung zu, dass entweder andere Faktoren als der Energiestatus der Zelle die Sirtuin-Aktivität regulieren oder dass sich die Sirtuin-Isoformen unterschiedlich zellulär regulieren lassen. Zudem könnte die Qualität (in Bezug auf den K_M-Wert) der Peptid-Substrate sich entscheidend auf den K_M-Wert von NAD⁺ auswirken. DENU et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Acylkettenlänge und dem K_M-NAD⁺-Wert für Sirt1-3 und Sirt6 nachweisen.^{90a} Dies bedeutet, je spezifischer ein Acylrest für eine bestimmte Sirtuin-Isoform ist, desto geringer ist der K_M-Wert für NAD⁺. Dies lässt sich

mit den NAD^+ - K_M -Werten bestätigen, die mittels der neuen direkten Messverfahren ermittelt wurden. Mit abnehmender Spezifität des intern gequenchten Fluoreszenz-Substrates (Sirt2 > Sirt3 > Sirt6) steigen auch die ermittelten K_M -Werte für NAD^+ von 33 μM für Sirt2 auf 386 μM für Sirt6.

Neben der kinetischen Charakterisierung neuer Substrate lassen die neuen sensitiven Messverfahren eine genaue und schnelle Charakterisierung von Sirtuin-Effektoren zu. Zum ersten Mal konnten K_i -Werte für die sehr potenten Thioxyacetyl-Peptid-Inhibitoren bestimmt werden. Die von HE *et al.* ermittelte Selektivität von Sirt5 gegenüber Thioxosuccinyl-Inhibitoren wurden mit dem neuen Protease-gekoppelten Assay verifiziert. Dies manifestiert sich in einem K_i -Wert im nanomolaren Bereich (<10 nM), während das entsprechende Thioxyacetyl-Peptid Sirt5 >10⁴-fach schlechter inhibiert und der K_i -Wert des Thioxosuccinyl-Inhibitors für Sirt2 5000-fach geringer ist (Manuskript 4.2.1. und 4.2.2.). Sirt2 weist eine höhere Spezifität für Thioxyacetyl- und Thioxomyristoyl-Inhibitoren auf, deren K_i -Werte >600-fach geringer sind als der K_i -Wert des thioxosuccinylierten Peptides. Auch die K_i -Werte des Thioxomyristoyl-Peptides liegen für Sirt3 und Sirt6 im nanomolaren Bereich. Das bestätigt, dass dieser Inhibitor nicht selektiv ist.^{60b} Eine Besonderheit der Thioxyacetyl-Inhibitoren zeigte sich bei der Auswertung der kinetischen Daten (gemessen mit Protease-gekoppelten Assay und direkten Assay). Kein klassisches Inhibitionsmodell konnte für die Charakterisierung verwendet werden, da bei steigender Inhibitorkonzentration sowohl der K_M -Wert sinkt als auch der k_{cat} -Wert steigt. Möglicherweise kann kein klassisches Inhibitionsmodell angewandt werden, da sich der Inhibitor erst während der Katalyse ausbildet. Aus den Daten ist aber erkennbar, dass die Thioxyacetyl-Inhibitoren eine kompetitive Komponente haben, welche auf die Konkurrenz zwischen Substrat-Peptid und Thioxyacetyl-Peptid zurückgeführt werden könnte, und eine nicht-kompetitive Komponente, welche vielleicht durch die Bildung des Inhibitors während der Katalyse erklärbar sein könnte. Die kurzen Messzeiten des direkten Assays ermöglichten sogar den Einfluss des *cis*- und des *trans*-Isomers der thioxyacetylierten Peptide zu untersuchen. Kinetische Untersuchungen der Isomere ergaben ähnliche IC_{50} -Werte mit einer minimalen Präferenz für das *cis*-Isomer. Diese Daten bestätigen wiederum eine hohe Flexibilität des aktiven Zentrums von Sirtuinen, welche es möglich macht beide Konfigurationsisomere mit ähnlicher Affinität zu binden.

Ein weiterer Inhibitor, welcher mit beiden neuen Assay-Verfahren untersucht wurde, ist NAM. Dieses Reaktionsprodukt ist in der Lage in höheren Konzentrationen während der Katalyse wieder an das Enzym zu binden und mit dem *O*-Alkylimidat zu reagieren. Widersprüchlich sind die Inhibitionsmodelle für NAM. Zum einen wird eine kompetitive Inhibition,^{63, 64c} als auch eine nicht-kompetitive Inhibition gegen NAD^+ beschrieben.⁹⁸ Messungen mit verschiedenen Methoden und mit unterschiedlichen Sirtuinen ergaben, dass NAM bei jedem der Sirtuine kompetitiv gegen NAD^+ und nicht-kompetitiv gegen das Peptidsubstrat wirkt (siehe Artikel

4.2.1. und 4.2.2.). Unterschiede bestehen aber im inhibitorischen Potential, mit welchem NAM verschiedene Sirtuin-Isoformen beeinflusst. Während Sirt6 nur einen K_i -Wert von 450 μM aufweist, zeigen Sirt3 und Sirt5 einen niedrigeren K_i -Wert (93 bzw. 15 μM) und werden damit sehr viel stärker durch NAM inhibiert. Kürzlich konnte eine Verbindung zwischen der Wechselzahl eines Peptidsubstrates und dem inhibitorischen Potential von NAM nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass je höher der k_{cat} -Wert ist, desto schlechter kann NAM das Sirtuin inhibieren.^{90a} Die Theorie lässt sich mit den in Artikel 4.2.1 und 4.2.2. beschriebenen Daten vereinbaren, denn auch hier korrelieren die Wechselzahl und der K_i -Wert.

Des Weiteren wurden andere *small molecule* Inhibitoren untersucht. Zum einen Ex-527, welcher wie NAM in der C-Tasche des Sirtuins bindet. Bisher wurde dieser Inhibitor nur auf seine Wirkung gegenüber Sirt1 und Sirt3 getestet und gilt als Sirt1-spezifisch.^{79b} Die Bestimmung des K_i -Wertes von Sirt6 ergab einen Wert von 100 μM , welcher die Sirt1-Spezifität des Inhibitors bestätigt, und zeigt, dass dieses Indol-Derivat ein effektiverer Inhibitor für Sirt6 ist als NAM. Zudem wurde vor kurzem das pflanzliche Quercetin als Inhibitor für Sirt6 beschrieben.^{65, 99} Aufgrund seiner Struktur wäre es möglich, dass dieses Flavonoid ähnlich wie NAM oder Ex-527 im aktiven Zentrum von Sirtuinen bindet. Ein erster Hinweis darauf liefert das nicht-kompetitive Verhalten, welches der Inhibitor gegenüber dem Peptidsubstrat zeigt. Weiterführende Untersuchungen, wie die Bestimmung des Inhibitionstyps gegen NAD^+ und Kristallstrukturanalysen könnten Informationen über den Inhibitionsmechanismus liefern. Darüber hinaus sollte auch hier der Einfluss beziehungsweise die Spezifität des Inhibitors gegenüber anderen Sirtuinen getestet werden.

Die Selektivität eines Inhibitors kann entscheidend für die Entwicklung von Medikamenten sein. Viele der bisher entwickelten und bereits beschriebenen Inhibitoren weisen höchstens eine erhöhte Spezifität gegen ein bestimmtes Sirtuin auf. Ein vielversprechender Kandidat in Bezug auf die Selektivität für Sirt2 ist das makrozyklische Peptid S2iL5, für welchen ein IC_{50} -Wert von 13 nM beschrieben wurde.^{62b} Kinetische Untersuchungen dieses Inhibitors gegen Sirt2 ergaben ein ähnliches Inhibitionsprofil, wie bereits für Thioxyacyl-Inhibitoren beschrieben, bei welchem sowohl der K_M - als auch der k_{cat} -Wert beeinflusst werden. Für S2iL5 konnte ein Modell erstellt werden, welches zwei Bindestellen für den Inhibitor annimmt, wobei der Inhibitor sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden kann.¹⁰⁰ Kristallstrukturen zeigten, dass das Peptid über sein trifluoracetyliertes Lysin im aktiven Zentrum bindet und ein anderer Teil des Makrozyklus an einem für Sirt2 spezifischen *loop* bindet.

Ein vergleichbares inhibitorisches Potential zeigt der Sirt2-selektive Inhibitor SirReal2 (Artikel 3.1.) mit einem K_i -Wert von 220 nM. Dieser bindet, nicht wie die bisher charakterisierten Inhibitoren anstelle des Peptidsubstrates oder in der C-Tasche, sondern an einer neuartigen Bindestelle, welche zwischen Rossmann-Spalte und Zink-Bindedomäne liegt (Artikel 3.1.,

Figure 2). Die Bindung des Inhibitors hält das Sirtuin in einer „offenen“ Form und sorgt für die Umordnung der Aminosäuren des aktiven Zentrums, sodass die Substrate zwar gebunden, aber, aufgrund einer veränderten Konformation des acetylierten Lysins, nicht umgesetzt werden. Eine aktuelle Studie über den zellulären Einfluss des Anästhetikums Propofol zeigte eine Inhibierung von Sirt2. Markierungsstudien und *molecular docking* Experimente ergaben, dass auch Propofol an einer bisher nicht bekannten Stelle von Sirt2 bindet.¹⁰¹ Diese wird durch die Aminosäuren Ile₁₆₉, Asp₁₇₀, Thr₁₇₁ und Ile₂₀₆ eingerahmt, welche nahe der Bindestelle von SirReal2 liegen. Aus den experimentellen Daten wird ersichtlich, dass eine Bindung von Propofol an diese Stelle des Enzyms eine Selektivität für Sirt2 hervorruft.

Die Entdeckung dieser Selektivitätsbindestelle eröffnet neue Möglichkeiten zur Entwicklung selektiver Sirt2 Inhibitoren und weist daraufhin, dass Sirtuine neben dem direkten Eingriff auf die Katalyse, beispielsweise durch Competition des Peptidsubstrates, auch andere Angriffspunkte für Effektoren bieten.

Zusammenfassung

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Acylspezifität von Sirt5 zu untersuchen. Hierfür wurde das zentrale Lysin eines CPS1-Peptides systematisch modifiziert und diese Peptide kinetisch mit Hilfe eines HPLC-Assays untersucht. Der Vergleich verschiedener Dicarbonsäureamide zeigte, dass Sirt5, neben den bereits bekannten Dicarbonsäure-Resten Malonyl und Succinyl, Glutaryl als Lysin-Modifikation bevorzugt (k_{cat}/K_M 19000 M⁻¹s⁻¹). Weiterhin offenbarte sich, dass die Konformation des Acyl-Lysins und damit auch die Interaktion mit Arg₁₀₅ und Tyr₁₀₂, welche die freie Carboxylgruppe fixieren, sich vor allem auf den k_{cat} -Wert auswirken. Die Bindung des Peptides, bestätigt durch ähnliche K_M - und K_D -Werte, wird nicht beeinflusst. Dies gilt nur insofern die Wechselwirkungen zu Arg₁₀₅ und Tyr₁₀₂ eingegangen werden können. Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Vielzahl von Glutaryl- oder Succinyl-Derivaten von Sirt5 als Substrat akzeptiert werden. Darunter befinden sich Substitutionen an C3, Einführung von Doppelbindungen oder der Austausch der mittleren Methylen-Gruppe durch Heteroatome. Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für die Entwicklung Sirt5-spezifischer Inhibitoren. Von den entwickelten Inhibitoren zeigte 3-Methyl-3-phenylsuccinyl-CPS1 das höchste Potential und eine hohe Sirt5-Spezifität.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand in der Charakterisierung des selektiven Sirt2-Inhibitors SirReal2, welcher durch die Analyse von Bibliotheken chemischer Verbindungen gefunden wurde. Der Inhibitor zeigt einen K_i -Wert im nanomolaren Bereich und ist nicht nur *in vitro* wirksam, sondern konnte auch als *in vivo* Sirt2-Inhibitor bestätigt werden. Die Besonderheit des Inhibitors ist, dass dieser mit einer bisher noch nicht bekannten Bindestelle interagiert (Selektivitätsbindestelle). Diese Bindestelle ist für Sirt2 in seiner Form einzigartig und sorgt

dafür, dass SirReal2 eine Konformation einnimmt, die eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbildet, und damit ein hohes inhibitorisches Potential ermöglicht.

Für die Entdeckung und Charakterisierung neuer Sirtuin-Effektoren sind zuverlässige und einfache Messverfahren notwendig. Die Entwicklung neuer Assay-Systeme konnte durch ein Protease-gekoppeltes und direktes kontinuierliches Messprinzip verwirklicht werden. Beide beruhen auf einem intern gequenchtem Peptidsubstrat, welche als Fluorophor 2-Aminobenzoessäureamide und als Quencher 3-Nitrotyrosin verwendet. Für den Protease-gekoppelten Assay wurde ein CPS1-Peptidderivat genutzt, welches das Fluorophor am *N*-Terminus und den Quencher in +2 Position zum Lysin trägt. Nach der Deacylierung durch Sirtuin, kann Trypsin das Peptid C-terminal des Lysins hydrolysieren, welches zur Änderung des Fluoreszenzsignals führt. Der direkte Assay beruht auf einem TNF α -Peptid, welches den Quencher in +1 Position zum Lysin enthält und das Fluorophor als Teil der Lysin-Modifikation. So entsteht nach Abspaltung des Acyls fluoreszierende *O*-Acyl-ADP-Ribose. Das Peptid kann für Sirt1 - Sirt6 ohne Veränderung des Substrates verwendet werden. Für Sirt2 wies dieses Peptid eine katalytische Effizienz von über $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auf und stellt damit für Sirt2 den höchsten bestimmten Wert dar.

Der Trypsin-gekoppelte Assay wurde für Sirt5 optimiert und dessen glutaryliertes CPS1-Substrat ist, mit einer katalytischen Effizienz von $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, damit das bisher beste gemessene Sirtuin-Substrat. Die Änderung des Acyl-Restes erlaubt in diesem Assay die Übertragung auf andere Sirtuine.

Mit beiden Assays konnten erfolgreich Substrate und Inhibitoren charakterisiert und diese mit der Übertragung auf Mikrotiterplatten (96- und 384-well) als Hochdurchsatzverfahren etabliert werden.

Literaturverzeichnis

1. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J* **1984**, 219 (2), 345-73.
2. Walsh, C. T.; Garneau-Tsodikova, S.; Gatto, G. J., Jr., Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, 44 (45), 7342-72.
3. (a) Trombetta, E. S.; Parodi, A. J., N-glycan processing and glycoprotein folding. *Adv Protein Chem* **2001**, 59, 303-44; (b) Vosseller, K.; Sakabe, K.; Wells, L.; Hart, G. W., Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Curr Opin Chem Biol* **2002**, 6 (6), 851-7; (c) Wells, L.; Vosseller, K.; Cole, R. N.; Cronshaw, J. M.; Matunis, M. J.; Hart, G. W., Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics* **2002**, 1 (10), 791-804.
4. Mann, M.; Ong, S. E.; Gronborg, M.; Steen, H.; Jensen, O. N.; Pandey, A., Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **2002**, 20 (6), 261-8.
5. (a) Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E., Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1964**, 51, 786-94; (b) Choudhary, C.; Weinert, B. T.; Nishida, Y.; Verdin, E.; Mann, M., The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, 15 (8), 536-50.
6. Choudhary, C.; Kumar, C.; Gnad, F.; Nielsen, M. L.; Rehman, M.; Walther, T. C.; Olsen, J. V.; Mann, M., Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **2009**, 325 (5942), 834-40.
7. (a) Xie, Z.; Dai, J.; Dai, L.; Tan, M.; Cheng, Z.; Wu, Y.; Boeke, J. D.; Zhao, Y., Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol Cell Proteomics* **2012**, 11 (5), 100-7; (b) Peng, C.; Lu, Z.; Xie, Z.; Cheng, Z.; Chen, Y.; Tan, M.; Luo, H.; Zhang, Y.; He, W.; Yang, K.; Zwaans, B. M.; Tishkoff, D.; Ho, L.; Lombard, D.; He, T. C.; Dai, J.; Verdin, E.; Ye, Y.; Zhao, Y., The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol Cell Proteomics* **2011**, 10 (12), M111 012658.
8. Tan, M.; Peng, C.; Anderson, K. A.; Chhoy, P.; Xie, Z.; Dai, L.; Park, J.; Chen, Y.; Huang, H.; Zhang, Y.; Ro, J.; Wagner, G. R.; Green, M. F.; Madsen, A. S.; Schmiesing, J.; Peterson, B. S.; Xu, G.; Ilkayeva, O. R.; Muehlbauer, M. J.; Braulke, T.; Muhlhausen, C.; Backos, D. S.; Olsen, C. A.; McGuire, P. J.; Pletcher, S. D.; Lombard, D. B.; Hirschey, M. D.; Zhao, Y., Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab* **2014**, 19 (4), 605-17.
9. Stevenson, F. T.; Bursten, S. L.; Fanton, C.; Locksley, R. M.; Lovett, D. H., The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90 (15), 7245-9.
10. (a) Chen, Y.; Sprung, R.; Tang, Y.; Ball, H.; Sangras, B.; Kim, S. C.; Falck, J. R.; Peng, J.; Gu, W.; Zhao, Y., Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics* **2007**, 6 (5), 812-9; (b) Garrity, J.; Gardner, J. G.; Hawse, W.; Wolberger, C.; Escalante-Semerena, J. C., N-lysine propionylation controls the activity of propionyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **2007**, 282 (41), 30239-45.
11. Tan, M.; Luo, H.; Lee, S.; Jin, F.; Yang, J. S.; Montellier, E.; Buchou, T.; Cheng, Z.; Rousseaux, S.; Rajagopal, N.; Lu, Z.; Ye, Z.; Zhu, Q.; Wysocka, J.; Ye, Y.; Khochbin, S.; Ren, B.; Zhao, Y., Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **2011**, 146 (6), 1016-28.
12. Moellering, R. E.; Cravatt, B. F., Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite. *Science* **2013**, 341 (6145), 549-53.

13. Roth, S. Y.; Denu, J. M.; Allis, C. D., Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **2001**, *70*, 81-120.
14. Wagner, G. R.; Payne, R. M., Widespread and enzyme-independent Nepsilon-acetylation and Nepsilon-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* **2013**, *288* (40), 29036-45.
15. Frye, R. A., Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *273* (2), 793-8.
16. Frye, R. A., Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *260* (1), 273-9.
17. (a) Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Pavletich, N. P., Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat Struct Biol* **2001**, *8* (7), 621-5; (b) Min, J.; Landry, J.; Sternglanz, R.; Xu, R. M., Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell* **2001**, *105* (2), 269-79; (c) Zhao, K.; Chai, X.; Clements, A.; Marmorstein, R., Structure and autoregulation of the yeast Hst2 homolog of Sir2. *Nat Struct Biol* **2003**, *10* (10), 864-71.
18. Rauh, D.; Fischer, F.; Gertz, M.; Lakshminarasimhan, M.; Bergbrede, T.; Aladini, F.; Kambach, C.; Becker, C. F.; Zerweck, J.; Schutkowski, M.; Steegborn, C., An acetylome peptide microarray reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms. *Nat Commun* **2013**, *4*, 2327.
19. Haigis, M. C.; Mostoslavsky, R.; Haigis, K. M.; Fahie, K.; Christodoulou, D. C.; Murphy, A. J.; Valenzuela, D. M.; Yancopoulos, G. D.; Karow, M.; Blander, G.; Wolberger, C.; Prolla, T. A.; Weindruch, R.; Alt, F. W.; Guarente, L., SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **2006**, *126* (5), 941-54.
20. Du, J.; Zhou, Y.; Su, X.; Yu, J. J.; Khan, S.; Jiang, H.; Kim, J.; Woo, J.; Kim, J. H.; Choi, B. H.; He, B.; Chen, W.; Zhang, S.; Cerione, R. A.; Auwerx, J.; Hao, Q.; Lin, H., Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science* **2011**, *334* (6057), 806-9.
21. Feldman, J. L.; Baeza, J.; Denu, J. M., Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *J Biol Chem* **2013**, *288* (43), 31350-6.
22. Avalos, J. L.; Boeke, J. D.; Wolberger, C., Structural basis for the mechanism and regulation of Sir2 enzymes. *Mol Cell* **2004**, *13* (5), 639-48.
23. (a) Jin, L.; Wei, W.; Jiang, Y.; Peng, H.; Cai, J.; Mao, C.; Dai, H.; Choy, W.; Bemis, J. E.; Jirousek, M. R.; Milne, J. C.; Westphal, C. H.; Perni, R. B., Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. *J Biol Chem* **2009**, *284* (36), 24394-405; (b) Hoff, K. G.; Avalos, J. L.; Sens, K.; Wolberger, C., Insights into the sirtuin mechanism from ternary complexes containing NAD⁺ and acetylated peptide. *Structure* **2006**, *14* (8), 1231-40.
24. (a) Smith, B. C.; Denu, J. M., Acetyl-lysine analog peptides as mechanistic probes of protein deacetylases. *J Biol Chem* **2007**, *282* (51), 37256-65; (b) Sauve, A. A.; Celic, I.; Avalos, J.; Deng, H.; Boeke, J. D.; Schramm, V. L., Chemistry of gene silencing: the mechanism of NAD⁺-dependent deacetylation reactions. *Biochemistry* **2001**, *40* (51), 15456-63; (c) Smith, B. C.; Denu, J. M., Sir2 protein deacetylases: evidence for chemical intermediates and functions of a conserved histidine. *Biochemistry* **2006**, *45* (1), 272-82.
25. Jackson, M. D.; Denu, J. M., Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta⁻-NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *J Biol Chem* **2002**, *277* (21), 18535-44.
26. Michishita, E.; Park, J. Y.; Burneskis, J. M.; Barrett, J. C.; Horikawa, I., Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* **2005**, *16* (10), 4623-35.
27. Tanno, M.; Sakamoto, J.; Miura, T.; Shimamoto, K.; Horio, Y., Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* **2007**, *282* (9), 6823-32.
28. (a) Liu, T.; Liu, P. Y.; Marshall, G. M., The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* **2009**, *69* (5), 1702-5; (b) 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* (1), 93-105.
29. (a) Guarente, L., Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* **2006**, *444* (7121), 868-74; (b) Luo, J.; Nikolaev, A. Y.; Imai, S.; Chen, D.; Su, F.; Shiloh, A.; Guarente, L.; Gu, W., Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **2001**, *107* (2), 137-48.
 30. Dong, X. C., Sirtuin biology and relevance to diabetes treatment. *Diabetes Manag (Lond)* **2012**, *2* (3), 243-257.
 31. Zhong, L.; D'Urso, A.; Toiber, D.; Sebastian, C.; Henry, R. E.; Vadysirisack, D. D.; Guimaraes, A.; Marinelli, B.; Wikstrom, J. D.; Nir, T.; Clish, C. B.; Vaitheesvaran, B.; Iliopoulos, O.; Kurland, I.; Dor, Y.; Weissleder, R.; Shirihai, O. S.; Ellisen, L. W.; Espinosa, J. M.; Mostoslavsky, R., The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell* **2010**, *140* (2), 280-93.
 32. Dominy, J. E., Jr.; Lee, Y.; Jedrychowski, M. P.; Chim, H.; Jurczak, M. J.; Camporez, J. P.; Ruan, H. B.; Feldman, J.; Pierce, K.; Mostoslavsky, R.; Denu, J. M.; Clish, C. B.; Yang, X.; Shulman, G. I.; Gygi, S. P.; Puigserver, P., The deacetylase Sirt6 activates the acetyltransferase GCN5 and suppresses hepatic gluconeogenesis. *Mol Cell* **2012**, *48* (6), 900-13.
 33. Vakhrusheva, O.; Smolka, C.; Gajawada, P.; Kostin, S.; Boettger, T.; Kubin, T.; Braun, T.; Bober, E., Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res* **2008**, *102* (6), 703-10.
 34. Ford, E.; Voit, R.; Liszt, G.; Magin, C.; Grummt, I.; Guarente, L., Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* **2006**, *20* (9), 1075-80.
 35. Hubbi, M. E.; Hu, H.; Kshitiz; Gilkes, D. M.; Semenza, G. L., Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors. *J Biol Chem* **2013**, *288* (29), 20768-75.
 36. Vaquero, A.; Scher, M. B.; Lee, D. H.; Sutton, A.; Cheng, H. L.; Alt, F. W.; Serrano, L.; Sternglanz, R.; Reinberg, D., SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* **2006**, *20* (10), 1256-61.
 37. North, B. J.; Marshall, B. L.; Borra, M. T.; Denu, J. M.; Verdin, E., The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **2003**, *11* (2), 437-44.
 38. Jiang, W.; Wang, S.; Xiao, M.; Lin, Y.; Zhou, L.; Lei, Q.; Xiong, Y.; Guan, K. L.; Zhao, S., Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol Cell* **2011**, *43* (1), 33-44.
 39. Jing, E.; Gesta, S.; Kahn, C. R., SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab* **2007**, *6* (2), 105-14.
 40. Lombard, D. B.; Alt, F. W.; Cheng, H. L.; Bunkenborg, J.; Streeper, R. S.; Mostoslavsky, R.; Kim, J.; Yancopoulos, G.; Valenzuela, D.; Murphy, A.; Yang, Y.; Chen, Y.; Hirschey, M. D.; Bronson, R. T.; Haigis, M.; Guarente, L. P.; Farese, R. V., Jr.; Weissman, S.; Verdin, E.; Schwer, B., Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* **2007**, *27* (24), 8807-14.
 41. Imai, S.; Guarente, L., Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci* **2010**, *31* (5), 212-20.
 42. Mathias, R. A.; Greco, T. M.; Oberstein, A.; Budayeva, H. G.; Chakrabarti, R.; Rowland, E. A.; Kang, Y.; Shenk, T.; Cristea, I. M., Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* **2014**, *159* (7), 1615-25.
 43. Hirschey, M. D.; Shimazu, T.; Goetzman, E.; Jing, E.; Schwer, B.; Lombard, D. B.; Grueter, C. A.; Harris, C.; Biddinger, S.; Ilkayeva, O. R.; Stevens, R. D.; Li, Y.; Saha, A. K.; Ruderman, N. B.; Bain, J. R.; Newgard, C. B.; Farese, R. V., Jr.; Alt, F. W.; Kahn, C. R.; Verdin, E., SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* **2010**, *464* (7285), 121-5.
 44. Shimazu, T.; Hirschey, M. D.; Hua, L.; Dittenhafer-Reed, K. E.; Schwer, B.; Lombard, D. B.; Li, Y.; Bunkenborg, J.; Alt, F. W.; Denu, J. M.; Jacobson, M. P.; Verdin, E., SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab* **2010**, *12* (6), 654-61.

45. (a) Schlicker, C.; Gertz, M.; Papatheodorou, P.; Kachholz, B.; Becker, C. F.; Steegborn, C., Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* **2008**, *382* (3), 790-801; (b) Ahn, B. H.; Kim, H. S.; Song, S.; Lee, I. H.; Liu, J.; Vassilopoulos, A.; Deng, C. X.; Finkel, T., A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (38), 14447-52.
46. Qiu, X.; Brown, K.; Hirschey, M. D.; Verdin, E.; Chen, D., Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab* **2010**, *12* (6), 662-7.
47. (a) Ogura, M.; Nakamura, Y.; Tanaka, D.; Zhuang, X.; Fujita, Y.; Obara, A.; Hamasaki, A.; Hosokawa, M.; Inagaki, N., Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *393* (1), 73-8; (b) Nakagawa, T.; Lomb, D. J.; Haigis, M. C.; Guarente, L., SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* **2009**, *137* (3), 560-70.
48. Nakamura, Y.; Ogura, M.; Ogura, K.; Tanaka, D.; Inagaki, N., SIRT5 deacetylates and activates urate oxidase in liver mitochondria of mice. *FEBS Lett* **2012**, *586* (23), 4076-81.
49. Park, J.; Chen, Y.; Tishkoff, D. X.; Peng, C.; Tan, M.; Dai, L.; Xie, Z.; Zhang, Y.; Zwaans, B. M.; Skinner, M. E.; Lombard, D. B.; Zhao, Y., SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell* **2013**, *50* (6), 919-30.
50. Yuan, H.; Marmorstein, R., Structural basis for sirtuin activity and inhibition. *J Biol Chem* **2012**, *287* (51), 42428-35.
51. (a) Yeung, F.; Hoberg, J. E.; Ramsey, C. S.; Keller, M. D.; Jones, D. R.; Frye, R. A.; Mayo, M. W., Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* **2004**, *23* (12), 2369-80; (b) Lim, J. H.; Lee, Y. M.; Chun, Y. S.; Chen, J.; Kim, J. E.; Park, J. W., Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell* **2010**, *38* (6), 864-78.
52. Wang, R. H.; Zheng, Y.; Kim, H. S.; Xu, X.; Cao, L.; Luhasen, T.; Lee, M. H.; Xiao, C.; Vassilopoulos, A.; Chen, W.; Gardner, K.; Man, Y. G.; Hung, M. C.; Finkel, T.; Deng, C. X., Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell* **2008**, *32* (1), 11-20.
53. (a) Yang, Y.; Hou, H.; Haller, E. M.; Nicosia, S. V.; Bai, W., Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *EMBO J* **2005**, *24* (5), 1021-32; (b) Wang, F.; Chan, C. H.; Chen, K.; Guan, X.; Lin, H. K.; Tong, Q., Deacetylation of FOXO3 by SIRT1 or SIRT2 leads to Skp2-mediated FOXO3 ubiquitination and degradation. *Oncogene* **2012**, *31* (12), 1546-57.
54. Kim, H. S.; Vassilopoulos, A.; Wang, R. H.; Lahusen, T.; Xiao, Z.; Xu, X.; Li, C.; Veenstra, T. D.; Li, B.; Yu, H.; Ji, J.; Wang, X. W.; Park, S. H.; Cha, Y. I.; Gius, D.; Deng, C. X., SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell* **2011**, *20* (4), 487-99.
55. Heltweg, B.; Gatabonton, T.; Schuler, A. D.; Posakony, J.; Li, H.; Goehle, S.; Kollipara, R.; Depinho, R. A.; Gu, Y.; Simon, J. A.; Bedalov, A., Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* **2006**, *66* (8), 4368-77.
56. Yang, M. H.; Laurent, G.; Bause, A. S.; Spang, R.; German, N.; Haigis, M. C.; Haigis, K. M., HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS. *Mol Cancer Res* **2013**, *11* (9), 1072-7.
57. Liu, P. Y.; Xu, N.; Malyukova, A.; Scarlett, C. J.; Sun, Y. T.; Zhang, X. D.; Ling, D.; Su, S. P.; Nelson, C.; Chang, D. K.; Koach, J.; Tee, A. E.; Haber, M.; Norris, M. D.; Toon, C.; Rooman, I.; Xue, C.; Cheung, B. B.; Kumar, S.; Marshall, G. M.; Biankin, A. V.; Liu, T., The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death Differ* **2013**, *20* (3), 503-14.
58. (a) Kim, H. S.; Patel, K.; Muldoon-Jacobs, K.; Bisht, K. S.; Aykin-Burns, N.; Pennington, J. D.; van der Meer, R.; Nguyen, P.; Savage, J.; Owens, K. M.; Vassilopoulos, A.; Ozden, O.; Park, S. H.; Singh, K. K.; Abdulkadir, S. A.; Spitz, D. R.; Deng, C. X.; Gius, D., SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* **2010**, *17* (1), 41-52;

- (b) Finley, L. W.; Carracedo, A.; Lee, J.; Souza, A.; Egia, A.; Zhang, J.; Teruya-Feldstein, J.; Moreira, P. I.; Cardoso, S. M.; Clish, C. B.; Pandolfi, P. P.; Haigis, M. C., SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization. *Cancer Cell* **2011**, *19* (3), 416-28.
59. (a) Smith, B. C.; Denu, J. M., Mechanism-based inhibition of Sir2 deacetylases by thioacetyl-lysine peptide. *Biochemistry* **2007**, *46* (50), 14478-86; (b) Kiviranta, P. H.; Suuronen, T.; Wallen, E. A.; Leppanen, J.; Tervonen, J.; Kyrilenko, S.; Salminen, A.; Poso, A.; Jarho, E. M., N(epsilon)-thioacetyl-lysine-containing tri-, tetra-, and pentapeptides as SIRT1 and SIRT2 inhibitors. *J Med Chem* **2009**, *52* (7), 2153-6.
60. (a) He, B.; Du, J.; Lin, H., Thiosuccinyl peptides as Sirt5-specific inhibitors. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (4), 1922-5; (b) He, B.; Hu, J.; Zhang, X.; Lin, H., Thiomyristoyl peptides as cell-permeable Sirt6 inhibitors. *Org Biomol Chem* **2014**, *12* (38), 7498-502.
61. 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* (14), 3423-7.
62. (a) Baba, R.; Hori, Y.; Mizukami, S.; Kikuchi, K., Development of a fluorogenic probe with a transesterification switch for detection of histone deacetylase activity. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (35), 14310-3; (b) Yamagata, K.; Goto, Y.; Nishimasu, H.; Morimoto, J.; Ishitani, R.; Dohmae, N.; Takeda, N.; Nagai, R.; Komuro, I.; Suga, H.; Nureki, O., Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure* **2014**, *22* (2), 345-52.
63. Avalos, J. L.; Bever, K. M.; Wolberger, C., Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* **2005**, *17* (6), 855-68.
64. (a) Jackson, M. D.; Schmidt, M. T.; Oppenheimer, N. J.; Denu, J. M., Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosylation by Sir2 histone/protein deacetylases. *J Biol Chem* **2003**, *278* (51), 50985-98; (b) Guan, X.; Lin, P.; Knoll, E.; Chakrabarti, R., Mechanism of Inhibition of the Human Sirtuin Enzyme SIRT3 by Nicotinamide: Computational and Experimental Studies. *PLoS One* **2014**, *9* (9), e107729; (c) Fischer, F.; Gertz, M.; Suenkel, B.; Lakshminarasimhan, M.; Schutkowski, M.; Steegborn, C., Sirt5 deacylation activities show differential sensitivities to nicotinamide inhibition. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e45098.
65. Kokkonen, P.; Rahnasto-Rilla, M.; Mellini, P.; Jarho, E.; Lahtela-Kakkonen, M.; Kokkola, T., Studying SIRT6 regulation using H3K56 based substrate and small molecules. *Eur J Pharm Sci* **2014**, *63*, 71-6.
66. Gertz, M.; Fischer, F.; Nguyen, G. T.; 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* (30), E2772-81.
67. Solomon, J. M.; Pasupuleti, R.; Xu, L.; McDonagh, T.; Curtis, R.; DiStefano, P. S.; Huber, L. J., Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* **2006**, *26* (1), 28-38.
68. (a) Lara, E.; Mai, A.; Calvanese, V.; Altucci, L.; Lopez-Nieva, P.; Martinez-Chantar, M. L.; Varela-Rey, M.; Rotili, D.; Nebbioso, A.; Roperio, S.; Montoya, G.; Oyarzabal, J.; Velasco, S.; Serrano, M.; Witt, M.; Villar-Garea, A.; Imhof, A.; Mato, J. M.; Esteller, M.; Fraga, M. F., Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. *Oncogene* **2009**, *28* (6), 781-91; (b) Grozinger, C. M.; Chao, E. D.; Blackwell, H. E.; Moazed, D.; Schreiber, S. L., Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* **2001**, *276* (42), 38837-43.
69. Peck, B.; Chen, C. Y.; Ho, K. K.; Di Fruscia, P.; Myatt, S. S.; Coombes, R. C.; Fuchter, M. J.; Hsiao, C. D.; Lam, E. W., SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9* (4), 844-55.
70. Kojima, K.; Ohhashi, R.; Fujita, Y.; Hamada, N.; Akao, Y.; Nozawa, Y.; Deguchi, T.; Ito, M., A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *373* (3), 423-8.

71. Outeiro, T. F.; Kontopoulos, E.; Altmann, S. M.; Kufareva, I.; Strathearn, K. E.; Amore, A. M.; Volk, C. B.; Maxwell, M. M.; Rochet, J. C.; McLean, P. J.; Young, A. B.; Abagyan, R.; Feany, M. B.; Hyman, B. T.; Kazantsev, A. G., Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* **2007**, *317* (5837), 516-9.
72. Hiratsuka, M.; Inoue, T.; Toda, T.; Kimura, N.; Shirayoshi, Y.; Kamitani, H.; Watanabe, T.; Ohama, E.; Tahimic, C. G.; Kurimasa, A.; Oshimura, M., Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *309* (3), 558-66.
73. (a) Yasuda, M.; Wilson, D. R.; Fugmann, S. D.; Moaddel, R., Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts. *Anal Chem* **2011**, *83* (19), 7400-7; (b) Singh, N.; Ravichandran, S.; Norton, D. D.; Fugmann, S. D.; Moaddel, R., Synthesis and characterization of a SIRT6 open tubular column: predicting deacetylation activity using frontal chromatography. *Anal Biochem* **2013**, *436* (2), 78-83.
74. Mostoslavsky, R.; Chua, K. F.; Lombard, D. B.; Pang, W. W.; Fischer, M. R.; Gellon, L.; Liu, P.; Mostoslavsky, G.; Franco, S.; Murphy, M. M.; Mills, K. D.; Patel, P.; Hsu, J. T.; Hong, A. L.; Ford, E.; Cheng, H. L.; Kennedy, C.; Nunez, N.; Bronson, R.; Frendewey, D.; Auerbach, W.; Valenzuela, D.; Karow, M.; Hottiger, M. O.; Hursting, S.; Barrett, J. C.; Guarente, L.; Mulligan, R.; Demple, B.; Yancopoulos, G. D.; Alt, F. W., Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **2006**, *124* (2), 315-29.
75. Kanfi, Y.; Naiman, S.; Amir, G.; Peshti, V.; Zinman, G.; Nahum, L.; Bar-Joseph, Z.; Cohen, H. Y., The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* **2012**, *483* (7388), 218-21.
76. Pacholec, M.; Bleasdale, J. E.; Chrnyk, B.; Cunningham, D.; Flynn, D.; Garofalo, R. S.; Griffith, D.; Griffor, M.; Loulakis, P.; Pabst, B.; Qiu, X.; Stockman, B.; Thanabal, V.; Varghese, A.; Ward, J.; Withka, J.; Ahn, K., SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* **2010**, *285* (11), 8340-51.
77. (a) Howitz, K. T.; Bitterman, K. J.; Cohen, H. Y.; Lamming, D. W.; Lavu, S.; Wood, J. G.; Zipkin, R. E.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L. L.; Scherer, B.; Sinclair, D. A., Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **2003**, *425* (6954), 191-6; (b) Kaerberlein, M.; McDonagh, T.; Heltweg, B.; Hixon, J.; Westman, E. A.; Caldwell, S. D.; Napper, A.; Curtis, R.; DiStefano, P. S.; Fields, S.; Bedalov, A.; Kennedy, B. K., Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem* **2005**, *280* (17), 17038-45.
78. (a) Hubbard, B. P.; Gomes, A. P.; Dai, H.; Li, J.; Case, A. W.; Considine, T.; Riera, T. V.; Lee, J. E.; E, S. Y.; Lamming, D. W.; Pentelute, B. L.; Schuman, E. R.; Stevens, L. A.; Ling, A. J.; Armour, S. M.; Michan, S.; Zhao, H.; Jiang, Y.; Sweitzer, S. M.; Blum, C. A.; Disch, J. S.; Ng, P. Y.; Howitz, K. T.; Rolo, A. P.; Hamuro, Y.; Moss, J.; Perni, R. B.; Ellis, J. L.; Vlasuk, G. P.; Sinclair, D. A., Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science* **2013**, *339* (6124), 1216-9; (b) Lakshminarasimhan, M.; Rauh, D.; Schutkowski, M.; Steegborn, C., Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Aging (Albany NY)* **2013**, *5* (3), 151-4.
79. (a) Hoffmann, G.; Breitenbucher, F.; Schuler, M.; Ehrenhofer-Murray, A. E., A novel sirtuin 2 (SIRT2) inhibitor with p53-dependent pro-apoptotic activity in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* **2014**, *289* (8), 5208-16; (b) Napper, A. D.; Hixon, J.; McDonagh, T.; Keavey, K.; Pons, J. F.; Barker, J.; Yau, W. T.; Amouzegh, P.; Flegg, A.; Hamelin, E.; Thomas, R. J.; Kates, M.; Jones, S.; Navia, M. A.; Saunders, J. O.; DiStefano, P. S.; Curtis, R., Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem* **2005**, *48* (25), 8045-54; (c) Suzuki, T.; Khan, M. N.; Sawada, H.; Imai, E.; Itoh, Y.; Yamatsuta, K.; Tokuda, N.; Takeuchi, J.; Seko, T.; Nakagawa, H.; Miyata, N., Design, synthesis, and biological activity of a novel series of human sirtuin-2-selective inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55* (12), 5760-73.
80. (a) Li, Y.; You, L.; Huang, W.; Liu, J.; Zhu, H.; He, B., A FRET-based assay for screening SIRT6 modulators. *Eur J Med Chem* **2015**, *96*, 245-9; (b) Marcotte, P. A.; Richardson, P.

- L.; Guo, J.; Barrett, L. W.; Xu, N.; Gunasekera, A.; Glaser, K. B., Fluorescence assay of SIRT protein deacetylases using an acetylated peptide substrate and a secondary trypsin reaction. *Anal Biochem* **2004**, *332* (1), 90-9.
81. Gertz, M.; Nguyen, G. T.; Fischer, F.; Suenkel, B.; Schlicker, C.; Franzel, B.; Tomaschewski, J.; Aladini, F.; Becker, C.; Wolters, D.; Steegborn, C., A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *PLoS One* **2012**, *7* (11), e49761.
 82. Madsen, A. S.; Olsen, C. A., Substrates for efficient fluorometric screening employing the NAD-dependent sirtuin 5 lysine deacylase (KDAC) enzyme. *J Med Chem* **2012**, *55* (11), 5582-90.
 83. Maurer, B.; Rumpf, T.; Scharfe, M.; Stolfa, D. A.; Schmitt, M. L.; He, W.; Verdin, E.; Sippl, W.; Jung, M., Inhibitors of the NAD(+)-Dependent Protein Desuccinylase and Demalonylase Sirt5. *ACS Med Chem Lett* **2012**, *3* (12), 1050-3.
 84. Roessler, C.; Nowak, T.; Pannek, M.; Gertz, M.; Nguyen, G. T.; Scharfe, M.; Born, I.; Sippl, W.; Steegborn, C.; Schutkowski, M., 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* (40), 10728-32.
 85. Smith, B. C.; Hallows, W. C.; Denu, J. M., A continuous microplate assay for sirtuins and nicotinamide-producing enzymes. *Anal Biochem* **2009**, *394* (1), 101-9.
 86. Minoshima, M.; Matsumoto, T.; Kikuchi, K., Development of a fluorogenic probe based on a DNA staining dye for continuous monitoring of the histone deacetylase reaction. *Anal Chem* **2014**, *86* (15), 7925-30.
 87. (a) Dhara, K.; Hori, Y.; Baba, R.; Kikuchi, K., A fluorescent probe for detection of histone deacetylase activity based on aggregation-induced emission. *Chem Commun (Camb)* **2012**, *48* (94), 11534-6; (b) Wang, Y.; Chen, Y.; Wang, H.; Cheng, Y.; Zhao, X., Specific Turn-On Fluorescent Probe with Aggregation-Induced Emission Characteristics for SIRT1 Modulator Screening and Living-Cell Imaging. *Anal Chem* **2015**.
 88. Loving, G.; Imperiali, B., A versatile amino acid analogue of the solvatochromic fluorophore 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimide: a powerful tool for the study of dynamic protein interactions. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (41), 13630-8.
 89. Jiang, H.; Khan, S.; Wang, Y.; Charron, G.; He, B.; Sebastian, C.; Du, J.; Kim, R.; Ge, E.; Mostoslavsky, R.; Hang, H. C.; Hao, Q.; Lin, H., SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature* **2013**, *496* (7443), 110-3.
 90. (a) Feldman, J. L.; Dittenhafer-Reed, K. E.; Kudo, N.; Thelen, J. N.; Ito, A.; Yoshida, M.; Denu, J. M., Kinetic and Structural Basis for Acyl-Group Selectivity and NAD Dependence in Sirtuin-Catalyzed Deacylation. *Biochemistry* **2015**; (b) Teng, Y. B.; Jing, H.; Aramsangtienchai, P.; He, B.; Khan, S.; Hu, J.; Lin, H.; Hao, Q., Efficient demyristoylase activity of SIRT2 revealed by kinetic and structural studies. *Sci Rep* **2015**, *5*, 8529.
 91. Zhao, J.; Micheau, J. C.; Vargas, C.; Schiene-Fischer, C., cis/trans photoisomerization of secondary thiopeptide bonds. *Chemistry* **2004**, *10* (23), 6093-101.
 92. Wildemann, D.; Schiene-Fischer, C.; Aumuller, T.; Bachmann, A.; Kiefhaber, T.; Lucke, C.; Fischer, G., A nearly isosteric photosensitive amide-backbone substitution allows enzyme activity switching in ribonuclease s. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (16), 4910-8.
 93. Frank, R.; Jakob, M.; Thunecke, F.; Fischer, G.; Schutkowski, M., Thioxylation as One-Atom-Substitution Generates a Photoswitchable Element within the Peptide Backbone We thank Dr. Peter Bayer for the NMR investigations and Dirk Wildemann for his assistance with the peptide syntheses. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the Fond der Chemischen Industrie, the Boehringer-Ingelheim-Stiftung, and the Land Sachsen-Anhalt. *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39* (6), 1120-1122.
 94. Gubbens, J.; Ruijter, E.; de Fays, L. E.; Damen, J. M.; de Kruijff, B.; Slijper, M.; Rijkers, D. T.; Liskamp, R. M.; de Kroon, A. I., Photocrosslinking and click chemistry enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chem Biol* **2009**, *16* (1), 3-14.

95. Putnam, C. D.; Arvai, A. S.; Bourne, Y.; Tainer, J. A., Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* **2000**, 296 (1), 295-309.
96. Pan, M.; Yuan, H.; Brent, M.; Ding, E. C.; Marmorstein, R., SIRT1 contains N- and C-terminal regions that potentiate deacetylase activity. *J Biol Chem* **2012**, 287 (4), 2468-76.
97. Satoh, A.; Stein, L.; Imai, S., The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handb Exp Pharmacol* **2011**, 206, 125-62.
98. Bitterman, K. J.; Anderson, R. M.; Cohen, H. Y.; Latorre-Esteves, M.; Sinclair, D. A., Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **2002**, 277 (47), 45099-107.
99. Singh, N.; Ravichandran, S.; Spelman, K.; Fugmann, S. D.; Moaddel, R., The identification of a novel SIRT6 modulator from *Trigonella foenum-graecum* using ligand fishing with protein coated magnetic beads. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2014**, 968, 105-11.
100. Schuster, S., *Entwicklung eines kontinuierlichen Histon-Deacetylase-Assays*. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2014.
101. Weiser, B. P.; Eckenhoff, R. G., Propofol Inhibits SIRT2 Deacetylase Through a Conformation-Specific, Allosteric Site. *J Biol Chem* **2015**.
102. Borra, M. T.; Langer, M. R.; Slama, J. T.; Denu, J. M., Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry* **2004**, 43 (30), 9877-87.

Anhang

Tabelle A1. Literaturwerte repräsentativ ausgewählter katalytischer Konstanten humaner Sirtuine.

Sirtuin	Herkunft des Peptids	Aminosäuresequenz	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	Quelle
Sirt1	H3	H-KQTARK(Ac)STGGKA-OH	38,0	$3,9 \cdot 10^{-2}$	10^3	20
		Ac-QTARK(Ac)STGGKAPRWW-NH ₂	29,0 ^(a)	0,46	$1,6 \cdot 10^4$	90a
		H-QTARK(Hex)STGGKAPRWW-NH ₂	9,7 ^(a)	$6,4 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^3$	90a
		H-QTARK(Dec)STGGKAPRWW-NH ₂	3,0 ^(a)	$3,4 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^4$	90a
		Ac-QTARK(Myf)STGGKAPRWW-NH ₂	2,2 ^(a)	$5,1 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^4$	90a
Sirt2	H3	H-KQTARK(Ac)STGGKA-OH	190,0	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^2$	20
		H-ARTKQTARK(Ac)STGGKAPRKQL-OH	24,0	0,24	10^4	102
		H-KSTGGK(Ac)APRKQ-OH	90,0	n.b.	$1,3 \cdot 10^3$	102
		H-ARTKQTARKSTGGK(Ac)APRKQ-OH	54,0	n.b.	$3,9 \cdot 10^3$	102
		H-KQTARK(Ac)STGGWW-OH	19,0	0,28	$1,5 \cdot 10^4$	90b
		H-KQTARK(Myf)STGGWW-OH	0,24	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$7,4 \cdot 10^4$	90b
		Ac-QTARK(Ac)STGGKAPRWW-NH ₂	18,0 ^(a)	0,39	$2,2 \cdot 10^4$	90a
		H-QTARK(Hex)STGGKAPRWW-NH ₂	40,0 ^(a)	$5,9 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^3$	90a
		H-QTARK(Dec)STGGKAPRWW-NH ₂	8,7 ^(a)	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$4,9 \cdot 10^3$	90a
	Ac-QTARK(Myf)STGGKAPRWW-NH ₂	11,0 ^(a)	$6,8 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^3$	90a	
	H4	H-SGRGK(Ac)GGKGLGKGGAKRHRK-OH	48,0	n.b.	$3,6 \cdot 10^3$	102
		H-SGRGKGGK(Ac)GLGKGGAKRHRK-OH	24,9	n.b.	$7,2 \cdot 10^3$	102
		H-SGRGKGGKGLGK(Ac)GGAKRHRK-OH	141,0	n.b.	$2,9 \cdot 10^3$	102
		H-SGRGKGGKGLGKGGAK(Ac)RHRK-OH	25,5	n.b.	$9,4 \cdot 10^3$	102
Tub	H-MPSDK(Ac)TIGG-OH	n.b.	0,14	$8,9 \cdot 10^2$	102	
Sirt3	H3	H-KQTARK(Ac)STGGKA-OH	50,0	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,4 \cdot 10^2$	20
		Ac-QTARK(Ac)STGGKAPRWW-NH ₂	98,0 ^(a)	0,33	$3,4 \cdot 10^3$	90a
		H-QTARK(Hex)STGGKAPRWW-NH ₂	>910 ^(a)	$7,2 \cdot 10^{-2}$	79	90a
		H-QTARK(Dec)STGGKAPRWW-NH ₂	120,0 ^(a)	0,12	$9,6 \cdot 10^2$	90a
		Ac-QTARK(Myf)STGGKAPRWW-NH ₂	36,0 ^(a)	0,12	$3,3 \cdot 10^3$	90a
Sirt5	H3	H-KQTARK(Ac)STGGKA-OH	n.b.	n.b.	2,0	20
		H-KQTARK(Ac)STGGWW-OH	n.b.	n.b.	7,8	20
		H-KQTARK(Mal)STGGWW-OH	6,1	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$6,1 \cdot 10^3$	20
		H-KQTARK(Suc)STGGWW-OH	5,8	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$4,3 \cdot 10^3$	20
	H4	Ac-LGK(Suc)-AMC	33,0	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$9,2 \cdot 10^2$	82
	GDH	H-SGASEK(Ac)DIVHSGWW-OH	n.b.	n.b.	<2,0	20
		H-SGASEK(Mal)DIVHSGWW-OH	8,7	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^3$	20
		H-SGASEK(Suc)DIVHSGWW-OH	14,0	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^3$	20
ACS2	H-KTRSGK(Ac)VMRRWW-OH	n.b.	n.b.	18	20	
	H-KTRSGK(Mal)VMRRWW-OH	150,0	$7,9 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^2$	20	

		H-KTRSGK(Suc)VMRRWW-OH	450,0	0,27	$6,0 \cdot 10^2$	20	
		Ac-K(Ac)-AMC	84,0	$9,0 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^2$	83	
		Z-K(Ac)-AMC	14,7	n.b.	n.b.	82	
Sirt6	H3	H-KQTARK(Ac)STGGWW-NH ₂	810,0	$3,9 \cdot 10^{-3}$	4,8	89	
		H-KQTARK(But)STGGWW-NH ₂	200,0	$2,1 \cdot 10^{-3}$	10,0	89	
		H-KQTARK(Okt)STGGWW-NH ₂	40,0	$4,6 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^2$	89	
		H-KQTARK(Myrist)STGGWW-NH ₂	3,4	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^3$	89	
		H-KQTARK(Pal)STGGWW-NH ₂	0,9	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^3$	89	
			H-QTARK(Hex)STGGKAPRWW-NH ₂	72,0 ^(a)	2,7	37,0	90a
			H-QTARK(Dec)STGGKAPRWW-NH ₂	19,0 ^(a)	$7,6 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^2$	90a
			Ac-QTARK(Myrist)STGGKAPRWW-NH ₂	14,0 ^(a)	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$8,2 \cdot 10^2$	90a
		TNF α	k.A. K19(Ac)	2,4	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^2$	89
			k.A. K20(Ac)	4,5	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^3$	89
	GDH	Dabcyl-ISGASEK(Ac)DIVHSE-Edans-G-OH	178,5	$2,4 \cdot 10^{-3}$	14	80a	
		Dabcyl-ISGASEK(Myrist)DIVHSE-Edans-G-OH	10,8	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^2$	80a	

Ac – Acetyl, Mal – Malonyl, Suc – Succinyl, Myr – Myristoyl, Okt – Oktanoyl, Dec – Decanoyl, Hex – Hexanoyl, Pal – Palmitoyl, n.b. – nicht bestimmt, k.A. – keine Angabe, (a) K_M -Wert für NAD^+

Publikationsliste und Nachweis des Eigenanteils

Schutkowski M, Fischer F, **Roessler C**, Steegborn C, *New assays and approaches for discovery and design of Sirtuin modulators*, Expert Opinion Drug Discovery 9 (2014), 183-199.

Eigenanteil: Anfertigung der Abbildungen 2B, 3A und 3B, Literaturrecherche und Entwurf Abschnitt 2.

Roessler C*, Nowak T*, Pannek M*, Gertz M, Nguyen GT, Scharfe M, Born I, Sippl W, Steegborn C, Schutkowski M, Chemical probing of human Sirtuin 5 active site reveals its substrate specificity and peptide-based inhibitors, *Angewandte Chemie International Edition English* 53 (2014), 10728-10732.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente zur Bestimmung der Substratspezifität von Sirtuin 5, Synthese und Reinigung der Peptidsubstrate, Anfertigung des Material und Methodenteils (50 %).

* gemeinsame Erstautorenschaft

Rumpf T, Schiedel M, Karaman B, **Roessler C**, North B, Lehotzky A, Olah J, Ladwein K, Schmidtkunz K, Gajer M, Pannek M, Steegborn C, Sinclair D, Gerhardt S, Ovadi J, Schutkowski M, Sippl W, Einsle O, Jung M, *Selective Sirt2-inhibition by ligand-induced rearrangement of the active site*, *Nature Communications* (2015), *in press*

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten, Synthese und Reinigung des Tubulin-Peptidsubstrates

Roessler C, Tüting C, Rauh D, Steegborn C, Schutkowski M, *A novel continuous assay for the deacetylase Sirtuin 5*, *Journal of Medicinal Chemistry*, *in revision*.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung 95 % aller Experimente, Anfertigung des Manuskriptes und des Material und Methodenteils.

Roessler C*, Schuster S*, Meleshin M, Zimmermann P, Simic Z, Schiene-Fischer C, Steegborn C, Hottiger M O, Schutkowski M, *First direct and continuous Sirtuin activity assay*, *Nature Communications* (2015), *submitted*.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung der kinetischen Experimente mittels HPLC (80 %), Anfertigung des Material und Methodenteils (50 %), Anfertigung der Abbildungen 2, 4 und 5

* gemeinsame Erstautorenschaft

Darlegung des Eigenanteils und Bestätigung durch einen Koautor:

Selbstständigkeits- und Einmaligkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle,

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Rößler
Adresse: Am Taubenbrunnen 11
06124 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 03.06.1987 in Halle (Saale)
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulische / Akademische Ausbildung

11.2011 – 12.2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Enzymologie

10.2006 – 09.2011 Studium **Biochemie** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit in der AG Naturstoffbiochemie: Vergleichende Charakterisierung der Substratspezifität ausgewählter L- und D-spezifischer Proteasen

 Abschluss als Dipl. Bio-Chem. (Gesamtnote: 1,2)

1999 - 06.2006 **Gymnasium** im Bildungszentrum (heute Christian-Wolff-Gymnasium) in Halle (Saale)

 Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife (Gesamtnote: 1,7)

Halle,
Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation praktisch, materiell und auch ideell unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Mike Schutkowski für die Überlassung dieses interessanten Themas, sein stetes Interesse, die zahlreichen Diskussionen und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Weiterhin möchte ich bei Dr. Ilona Born, Dr. Stephan König und Dr. David Rauh für ihre wertvollen Ratschläge und Anregungen danken.

Bei Dr. Angelika Schierhorn und Christina Gersching möchte ich mich für die vielen Massenspektren bedanken, die sie für mich aufgenommen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden Antonia Masch, Theresa Nowak und Željko Simić für die tolle Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen (auch im Privaten) und den Spaß, den wir auf Tagungen und im Labor hatten.

Bei Prof. Dr. Clemens Steegborn und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich an dieser Stelle für die gute Zusammenarbeit und die vielen Sirtuinlieferungen bedanken.

Bei Tobias Rumpf und Prof. Dr. Manfred Jung möchte ich für die Möglichkeit bedanken SirReal2 charakterisieren zu dürfen.

Dr. Marat Meleshin danke ich für Synthesen, dessen Schwierigkeitsgrad nicht hoch genug sein konnten, und für die Synthesestrategien, die es uns sehr vieles einfacher machen.

Ich danke Christian Tüting für die Unterstützung bei der Entwicklung des Proteasegekoppelten Assays.

Ein großer Dank geht an Coco, die es geschafft hat mich, mit ihren Einfällen, immer in Trab zu halten.

Ich möchte mich auch bei Karin Jentsch und Christa Langer bedanken, die uns oft aushelfen konnten, wenn mal etwas fehlte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Sabine Schuster für ihren unermüdlichen Einsatz in der Assayentwicklung, die endlosen Diskussionen und die schöne Zeit.

Allen nicht namentlich genannten Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Enzymologie sei für die freundliche Atmosphäre und stete Hilfeleistung, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, gedankt.

Der wohl größte Dank gebührt meinen Eltern und meinen Freunden für ihre Unterstützung und für all die anderen Dinge, die hier nicht aufzählbar sind.