

Strukturbasierte Entwicklung einer Affinitätssonde für Sirtuin 2

*Matthias Schiedel, Tobias Rumpf, Berin Karaman, Attila Lehoczky, Stefan Gerhardt, Judit Ovádi, Wolfgang Sippl, Oliver Einsle und Manfred Jung**

Abstract: Sirtuine spalten NAD⁺-abhängig Acylreste von Lysinen in Proteinen ab. Eine Fehlregulation von humanem Sirt2 wurde mit der Entstehung von Krebs, entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht, was es zu einem vielversprechenden Zielprotein für die Wirkstoffforschung macht. Hier präsentieren wir die Entwicklung der ersten Sirt2-selektiven Affinitätssonde auf Basis einer Kristallstruktur von Sirt2 in Komplex mit einem optimierten Hemmstoff aus der Klasse der SirReals („Sirtuin Rearranging Ligands“). Dieser zeigt verbesserte Wirkpotenz, Wasserlöslichkeit und zelluläre Wirksamkeit. Die langsame Dissoziation des Enzym-Sonden-Komplexes ermöglicht die Erschließung neuer Anwendungsgebiete für die SirReals, darunter biophysikalische Charakterisierungsmethoden, fragmentbasiertes Wirkstoffscreening und Pull-Down-Experimente. Dies macht unsere SirReal-Sonde zu einem wertvollen Werkzeug für weiterführende Studien in der Sirtuin-Biologie.

NAD⁺-abhängige Proteindesacylasen, sogenannte Sirtuine, wurden ursprünglich als Histondesacetylasen (HDACs) der Klasse III beschrieben.^[1] In den zurückliegenden Jahren wurde jedoch auch eine Vielzahl an Nicht-Histon-Substraten, wie etwa p53,^[2] NFκB,^[3] α-Tubulin^[4] und BubR1^[5] identifiziert. Neben der Nε-Desacytylierung acetylierter Lysinseitenketten sind Sirtuine in der Lage, die Abspaltung weiterer posttranslationaler Proteinmodifikationen zu katalysieren, z.B. eine Demyristoylierung^[6] oder Desuccinylierung.^[7] Zudem katalysieren Sirtuine ADP-Ribosylierungen.^[8] Durch Wechselwirkungen mit ihren Substratproteinen sind Sirtuine an der Regulation unterschiedlichster zellulärer Prozesse

beteiligt, darunter Apoptose, Mitose, entzündliche Prozesse, Zellarterung und Metabolismus. Das menschliche Genom kodiert für sieben unterschiedliche Sirtuin-Isotypen, die sich durch ihre subzelluläre Lokalisation und ihre katalytische Aktivität unterscheiden.^[9] Das humane Sirtuin 2 (Sirt2) wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen. Durch die Desacylierung seiner Substrate agiert Sirt2 als wesentlicher Regulator von Zellzyklus,^[4] Autophagie^[10] und peripherer Myelinierung^[11] sowie als Suppressor von Entzündungen im ZNS.^[12] Auch die Beteiligung von Sirt2 an der Tumorgenese ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Grundsätzlich kann Sirt2 bei bestimmten Krebsarten als Tumorsuppressor angesehen werden,^[13] jedoch konnte auch gezeigt werden, dass es in der Lage ist, eine entgegengesetzte Funktion als Promotor des Tumorwachstums auszuüben.^[14] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Sirt2-katalysierte Desacetylierung von H3K18Ac einen entscheidenden Einfluss auf die Wirtszelltranskription im Verlauf von bakteriellen Infektionen hat.^[15] In Anbetracht der Diversität der Sirt2-Substrate und der damit verbundenen nachgeschalteten Effekte ist es offensichtlich, dass potente und selektive Sirt2-Hemmstoffe benötigt werden, um das Potenzial von Sirt2 als mögliches Zielprotein für Therapieansätze zur Bekämpfung von Krebs, entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen genauer zu untersuchen. Obwohl in letzter Zeit eine Reihe hochpotenter Sirt2-Hemmstoffe beschrieben wurde (siehe Abbildung S1),^[16] ist bis zum heutigen Tage kein Sirt2-selektiver Inhibitor Gegenstand klinischer Studien. Potente, isotypselektive und wirkstoffähnliche Modulatoren der Sirt2-Aktivität mit nachgewiesener zellulärer Wirksamkeit sind immer noch rar. Kürzlich konnten wir mit den so genannten SirReals („Sirtuin Rearranging Ligands“) eine neue Klasse von hochpotenten und gleichermaßen selektiven Sirt2-Hemmstoffen etablieren (Abbildung 1).^[17]

Infolge ihrer Bindung verursachen diese Inhibitoren eine strukturelle Umordnung des aktiven Zentrums von Sirt2 und erschließen so eine bisher unbekannte Bindungstasche. Dieser besondere Wirkmechanismus bildet die Grundlage sowohl für die hohe Wirkpotenz der SirReals als auch in besonderem Maße für ihre Isotypselektivität. Daher wurde die neu gebildete Bindungstasche als „Selektivitätsbindungsta-

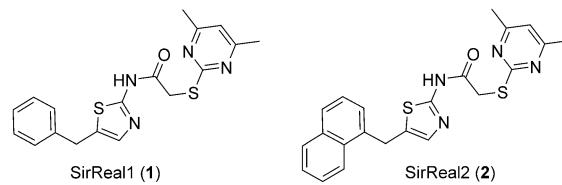


Abbildung 1. Strukturen der Sirt2-Hemmstoffe SirReal1 (1) und SirReal2 (2).

 Magyar Tudósok Körüje 2, 11-1117 Budapest (Hungary)
 Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201509843> zu finden.

sche“ bezeichnet. SirReal2 (**2**) ist mit einem IC_{50} -Wert von $0.4 \mu\text{M}$ an Sirt2 und einer bemerkenswerten Selektivität der vielversprechendste Vertreter unter den SirReals der ersten Generation.^[17] Zur weiteren Charakterisierung dieser Inhibitorklasse und um die einzigartigen Eigenschaften der SirReals für neue Anwendungen zu erschließen, haben wir uns entschlossen, eine Affinitätssonde für Sirt2 zu entwickeln. Dieser Prozess wurde von den strukturellen Erkenntnissen gelenkt, die wir aus Sirt2-SirReal-Komplexen gewinnen konnten. Um Zugang zum Sirt2-gebundenen SirReal zu erlangen, ohne dass der Ligand an Affinität und Selektivität einbüßt, wollten wir den Acyllysin-Tunnel nutzen, der vom aktiven Zentrum von Sirt2 bis hin zur Proteinoberfläche führt. Da die Methyarylgruppe der SirReals diesem Tunnel zugewandt ist,^[17] brachten wir einen PEG-Linker, der eine Biotin-Markierung an einem seiner Enden trägt, an diesen Teil des Inhibitors an. Da Docking-Experimente ergaben, dass größere Substituenten am Naphthylrest des potenteren SirReal2 (**2**) zu einer sterischen Hinderung der Ligandenbindung führen sollten, wählten wir das weniger sperrige Benzylderivat SirReal1 (**1**) als Ausgangspunkt für die Entwicklung der Sirt2-Affinitätssonde (Abbildung S2).

Um unsere Herangehensweise bei der Entwicklung der Sonde zu überprüfen, synthetisierten wir zunächst die beiden neuen SirReals (**9**, **10**; Schema 1), angelehnt an die von uns bereits beschriebene Synthese von SirReal1 (**1**).^[17] Im ersten Schritt wurde 3-Aminophenol (**3**) propargyliert, dann wurde **4** über eine Meerwein-Reaktion zum α -Chlorpropanal **5** um-

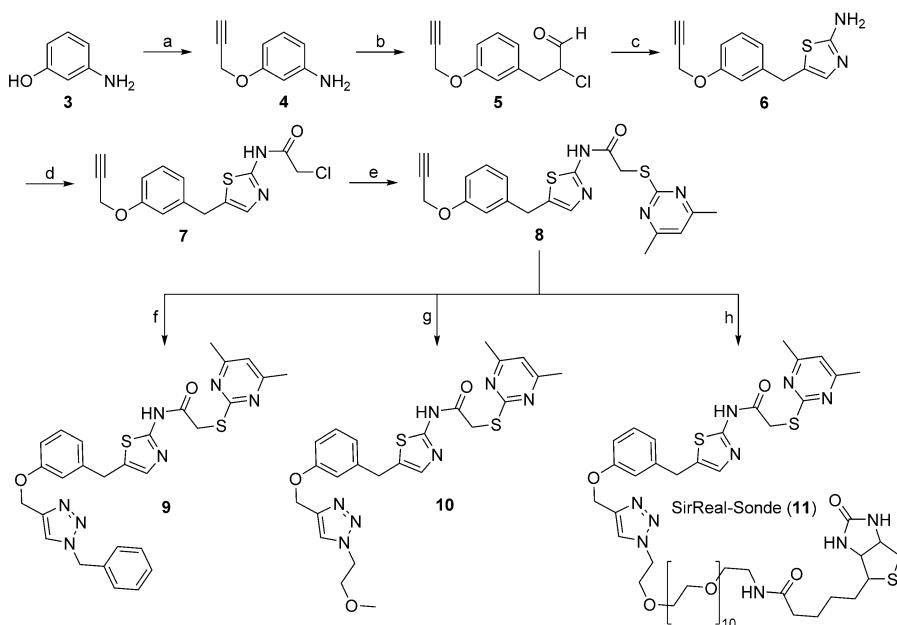
gesetzt.^[18] Durch Kondensation von **5** mit Thioharnstoff wurde die Verbindung **6** mit Aminothiazol-Grundgerüst gewonnen.^[18b] Die Acetylierung von **6** mit Chloracetylchlorid lieferte Verbindung **7**, die anschließend durch nukleophile Substitution mit Dimethylmercaptopyrimidin Verbindung **8** ergab.^[19] Zuletzt wurde **8** in einer Cu-katalysierten Huisgen-Cycloaddition zu **9** und **10** oder zur SirReal-Affinitätssonde (**11**) umgesetzt.^[20]

Die Triazole **9** und **10** konnten durch Testung in einem homogenen fluoreszenzbasierten Sirt2-Aktivitätsassay^[21] als neue Sirt2-Hemmstoffe identifiziert werden (Tabelle 1), die mehr als 20-fach potenter sind als ihre Stammverbindung SirReal1 (**1**).

Diese SirReals der zweiten Generation zeigen neben einer verstärkten Wirkpotenz eine verbesserte Wasserlöslichkeit unter Beibehaltung der exzellenten Isotypselektivität der SirReals der ersten Generation (Tabelle 1). Durch eine

Tabelle 1: IC_{50} -Werte der SirReals der zweiten Generation (**9**, **10**), der SirReal-Sonde (**11**) und von SirReal1 und 2 (**1**, **2**) als Vergleichssubstanzen.

Verbindung	Sirt1 IC_{50} [μM]	Sirt2 IC_{50} [μM]	Sirt3 IC_{50} [μM]
1	>100	3.745 ± 0.831	>100
2	>100	0.435 ± 0.083	>100
9	>100	0.163 ± 0.014	>100
10	>100	0.118 ± 0.006	>100
11	>100	0.305 ± 0.111	>100



Schema 1. Synthese von **9**, **10** und der SirReal-Sonde (**11**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen:
a) Propargylbromid, NaOH, Acetonitril, 20°C, 12 h, 75% Ausbeute; b) NaNO₂, HCl, Wasser, 0°C, 20 min; dann Acrolein, CuCl₂·2 H₂O, Aceton, 20°C, 3 h; c) Thioharnstoff, Ethanol, Rückfluss, 2 h, 18% Ausbeute über zwei Stufen; d) Chloracetylchlorid, DIPEA, Acetonitril, 20°C, 2 h, 99% Ausbeute; e) 4,6-Dimethylmercaptopyrimidin, Na₂CO₃, KI, DMSO, 20°C, 2 h, 76% Ausbeute; f) Benzylazid, Natriumascorbat, CuSO₄, TBTA, Wasser/tBuOH/DMF (1:1:1), 20°C, 12 h, 72% Ausbeute; g) 1-Azido-2-methoxyethan, Natriumascorbat, CuSO₄, TBTA, Wasser/tBuOH/DMF (1:1:1), 20°C, 12 h, 50% Ausbeute; h) Azido-PEG11-biotin-Konjugat, Natriumascorbat, CuSO₄, TBTA, Wasser/tBuOH/DMF (1:1:1), 20°C, 12 h, 37% Ausbeute.

Kristallstruktur von Sirt2 in Komplex mit **9** gelang es uns, den vorhergesagten Bindungsmodus zu bestätigen (PDB-ID 5DY5). **9** bindet an Sirt2 ähnlich wie SirReal1 und 2.^[17] Im Vergleich zum Benzylrest von SirReal1 (**1**) im Komplex mit Sirt2 ist jedoch der Benzyloxyrest von **9** leicht verdreht. So gelang es, wie geplant mit dem substituierten Triazol auch den Acyllysin-Tunnel zu besetzen, was bei SirReal1 und 2 nicht der Fall ist. Eine zusätzliche Stabilisierung der Ligandenbindung wird durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Triazolteil und Arg97 der Kofaktorbindungsschleife ermöglicht (Abbildung 2 und S3).

Da wir also zeigen konnten, dass der N-substituierte Triazolrest dem Eingang des Acyllysin-Tunnels zugewandt ist, konnten wir wie geplant mit der Entwicklung unserer SirReal-Sonde fortfahren. Um festzustellen, ob die zusätzlichen triazolvermittelten Wechselwirkungen und die Besetzung des Acyllysin-Tunnels auch unter physiologischen Bedingungen von Bedeutung sind,

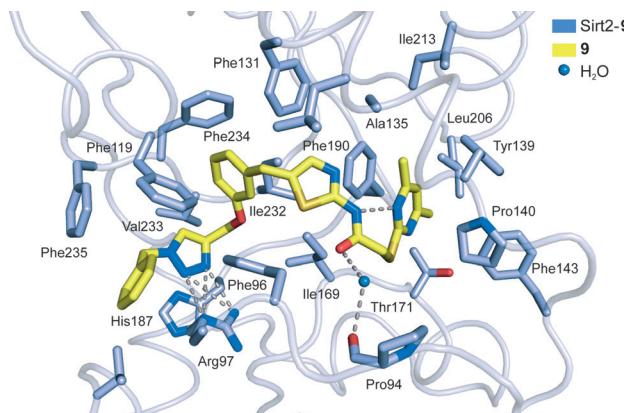


Abbildung 2. Bindungsmodus von **9** (Stabmodell, gelb) in Sirt2, wechselwirkende Aminosäurereste in blau. Wasserstoffbrücken sind als graue gestrichelte Linien dargestellt, ein Wassermolekül als blaue Kugel.

haben wir die zelluläre Aktivität von **9** und **10** mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die SirReals der zweiten Generation führen im Vergleich zur vorherigen Leitstruktur SirReal2 (**2**) zu einer verstärkten Tubulin-Hyperacetylierung (Abbildung S4), was sowohl eine Folge ihrer verstärkten Wirkpotenz als auch der verbesserten Wasserlöslichkeit sein kann. Daher synthetisierten wir schließlich wie geplant die SirReal-Sonde (**11**), indem wir das Alkinderivat **8** mit einem pegyierten Biotin mit endständiger Azidfunktion umsetzten (Schema 1). Für die erhaltene Sonde konnten wir in einem homogenen fluoreszenzbasierten Aktivitätsassay^[21] einen IC_{50} -Wert von $0.3 \mu\text{M}$ bestimmen. Zur weiteren biophysikalischen Charakterisierung der SirReal-Sonde verwendeten wir die Biolayer-Interferometrie. Diese ermöglicht es, Wechselwirkungen zwischen der immobilisierten SirReal-Sonde und Sirt2 als Verschiebung des Interferenzmusters des an einer Biolayer reflektierten Lichtstrahls nachzuverfolgen. Dabei konnten wir eine dosisabhängige Bindung von Sirt2 an die immobilisierte Sonde zeigen, und als Geschwindigkeitskonstanten wurden $k_{\text{on}} = 6.89 \pm 0.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 6.99 \pm 0.31 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Dies resultiert in einem KD-Wert von $0.1 \mu\text{M}$ (Abbildung 3a). Die Linearität der Bindung ($r^2 = 0.9774$) ist in Abbildung S5 dargestellt. Die bereits erwähnte „Selektivitätsbindungsstasche“ wird von zwei Schleifen der Scharnierregion gebildet, die eine Domäne mit Rossmann-Faltung mit der Zinkbindungsdomäne verknüpfen. Sirt2 vollzieht während des Katalysevorgangs eine Konformationsänderung, bei der sich die genannten Domänen einander annähern. Binden SirReals im aktiven Zentrum von Sirt2, wird dieser Prozess unterbunden, wobei das Enzym in seiner offenen Konformation stabilisiert wird.^[17] Durch unsere kinetischen Untersuchungen, die eine sehr langsame Dissoziation des Liganden belegen, konnte wir zeigen, dass Sirt2 den gebundenen Liganden im Rahmen der Konformationsänderung im aktiven Zentrum einschließt. Dies hat eine verlängerte Verweildauer des Liganden im aktiven Zentrum zur Folge und ist verantwortlich für die langsame Dissoziation des Enzym-Liganden-Komplexes (siehe Abbildung 3a).^[22] Im Unterschied zu einer bereits beschriebenen Affinitätssonde für Sirtuine^[23] verfügt unsere SirReal-

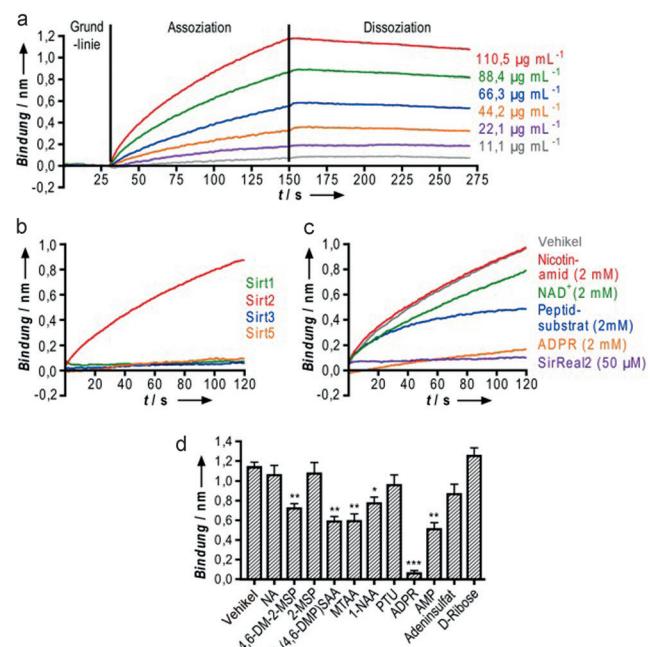


Abbildung 3. Biophysikalische Charakterisierung der SirReal-Sonde (**11**) mittels Biolayer-Interferometrie. a) Repräsentative Sensorgramme unterschiedlicher Konzentrationen von Sirt2, die an immobilisiertes **11** binden. b) Repräsentative Sensorgramme (ausschließlich Assoziation dargestellt) unterschiedlicher Sirtuin-Isotypen ($1.7 \mu\text{M}$), die an immobilisiertes **11** binden. c) Repräsentative Sensorgramme (ausschließlich Assoziation dargestellt) von Sirt2 ($110.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), das nach Vorinkubation mit potenziellen Liganden an immobilisiertes **11** bindet. d) Am Ende der Assoziationsphase aufgezeichnete Interferenzverschiebung [nm] nach Vorinkubation von Sirt2 ($110.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) mit den angegebenen Liganden, bzw. deren Fragmenten (5 mM, Strukturformeln in Abbildung S6). NA = Nicotinamid, 4,6-DM-2-MSP = 4,6-Dimethyl-2-methylsulfanylpyrimidin, 2-MSP = 2-Methylsulfanylpyrimidin, 2-(4,6-DMP)SAA = 2-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)sulfanylacetamid, MTAA = N-(5-Methylthiazol-2-yl)acetamid, 1-NAA = 1-Naphthylessigsäure, PTU = Propylthiouracil, ADPR = Adenosindiphosphat-Ribose, AMP = Adenosinmonophosphat, Statistik (t-Test): * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.0001$

Sonde über eine ausgezeichnete Isotypselektivität für Sirt2 (Abbildung 3b). Um den angenommenen Bindungsmodus unserer Sonde zu bestätigen, wurde Sirt2 mit möglichen Liganden vorinkubiert, bevor es mit der immobilisierten Sonde zusammengebracht wurde. Wir beobachteten eine Kompetition unserer SirReal-Sonde mit NAD⁺, einem Acetyllysins-Oligopeptid, ADPR und SirReal2 (Abbildung 3c). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den kinetischen Untersuchungen zur SirReal1-vermittelten Hemmung.^[17] Als Negativkontrolle verwendeten wir Nicotinamid, den physiologischen Hemmstoff der Sirtuine, der keine Kompetition zur SirReal-Sonde zeigte. Dieser Befund wird durch vorangegangene strukturbiologische Studien aus unserem Labor gestützt, die belegen, dass eine gleichzeitige Bindung von SirReals und Nicotinamid möglich ist. Um die Eignung unserer SirReal-Sonde für weitere Anwendungsgebiete zu untersuchen, führten wir Machbarkeitsstudien für fragmentbasiertes Wirkstoffscreening und Affinitäts-Pull-Down-Experimente durch. Wegen der meist geringen Affinität von Wirkstoff-

fragmenten ($M_r < 250$ Da) zu ihrem Zielprotein wird fragmentbasiertes Screening üblicherweise bei sehr hohen Ligandenkonzentrationen durchgeführt. Dies schränkt den Einsatz von biochemischen Aktivitätsassays, die auf spektroskopischen Methoden wie Fluoreszenz- oder UV/Vis-Spektroskopie beruhen, deutlich ein.^[24] Biophysikalische Methoden wie die Biolayer-Interferometrie sind bezüglich Assayinterferenzen weniger störanfällig und daher für fragmentbasiertes Screening besser geeignet.^[25] Um die Eignung unserer SirReal-Sonde in Kombination mit der Biolayer-Interferometrie für fragmentbasierte Screeningansätze zu prüfen, testeten wir Fragmente von SirReal2 (**2**) und ADPR. Diese wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Bindung zwischen Sirt2 und der immobilisierten Sonde zu verringern (Abbildung 3d und S6). Wie erwartet führten sowohl die Fragmente von SirReal2 (**2**) als auch AMP als Fragment von ADPR zu einer signifikanten Abschwächung der Bindung von Sirt2 an die Sonde. Zudem konnten wir im Rahmen dieser Untersuchungen die Bedeutung der Methylierung am Pyrimidinring für die Bindung an Sirt2 bestätigen,^[17] da das dimethylierte Fragment (4,6-DM-2-MSP), im Gegensatz zum Fragment ohne die genannten Methylgruppen (2-MSP), eine signifikante Abnahme der Sirt2-Bindung bewirkt. Die Negativkontrolle Nicotinamid (NA) und Propylthiouracil (PTU), ein Pyrimidinderivat, das sich strukturell von 4,6-DM-2-MSP unterscheidet, hatten keinen Effekt auf die Bindung von Sirt2 an die immobilisierte SirReal-Sonde. Des Weiteren wollten wir die Eignung unserer SirReal-Sonde für Affinitätsaufreinigungen und Pull-Down-Experimente untersuchen. Mithilfe unserer SirReal-Sonde gelang es uns, Sirt2 selektiv aus unterschiedlichen komplexen Matrices zu extrahieren, sogar in Gegenwart des ähnlichen Sirt1 oder des unspezifisch ligandenbindenden Proteins BSA (bovines Serumalbumin). Wir konnten dies anhand einer modellhaften Mischung der drei genannten Proteine (Abbildung S7a), einer Mischung von *E. coli*-Lysaten, die überexprimiertes Sirt1 oder Sirt2 enthielten (Abbildung S7b,c) und schließlich eines nativen Lysats von HL60-Zellen (Abbildung 4 und S7d,e) zeigen. Die Spezifität des Pull-Downs konnte durch effektive Blockade der Sirt2-Anreicherung sowohl durch Biotin als auch durch SirReal2 (**2**) demonstriert werden (Abbildung S7a). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Isotypselektivität, Robustheit und die breite Anwendbarkeit

unserer SirReal-Sonde für Affinitätsaufreinigungen und Pull-Down-Experimente.

Im Rahmen dieser Studie berichten wir über die strukturbasierte Entwicklung einer Affinitätssonde für Sirt2. Unterstützt wurde das Design der Sonde durch strukturelle Einblicke aus Sirt2-SirReal-Kokristallstrukturen, durch molekulare Docking-Experimente und durch die Synthese wirkstoffähnlicher Analoga der Sonde. Diese ragen in den Acetyl- und Pyrimidin-Tunnel hinein, was mittels Röntgenkristallographie bestätigt werden konnte. Die neuen Hemmstoffe verfügen, im Vergleich zu ihrer vorherigen Leitstruktur SirReal2, über eine verstärkte Wirkpotenz, eine verbesserte Wasserlöslichkeit und eine gesteigerte zelluläre Wirksamkeit. Diese Erkenntnisse sind für die Wirkstoffforschung im Bereich der Sirtuin-Inhibitoren von besonderer Bedeutung. Unsere neuartige SirReal-Sonde ist, unter Beibehaltung der Wirkpotenz und Isotypselektivität der SirReals, in der Lage, Sirt2 selektiv aus unterschiedlichen Matrices an sich zu binden. Basierend auf unseren biophysikalischen Untersuchungen ist die langsame Dissoziation des Ligand-Enzym-Komplexes ausschlaggebend für die starke Bindung. Eine Verringerung von k_{off} wurde kürzlich als einer der entscheidenden Schritte bei der Wirkstoffentwicklung hin zu Hemmstoffen mit optimierter zellulärer Wirksamkeit postuliert.^[22] Dieses Prinzip wurde hier zum ersten Mal systematisch bei der strukturbasierten Entwicklung einer Affinitätssonde angewendet. Die neue SirReal-Sonde bildet die Grundlage für vielfältige Anwendungen, wie fragmentbasiertes Screening, kinetische Messungen und den Einsatz zur Hemmstoffcharakterisierung. Darüber hinaus eröffnet unsere SirReal-Sonde neue Möglichkeiten für die Analyse der Funktionen von Sirt2 bei biologischen und medizinisch relevanten Prozessen. Laufende Untersuchungen zielen darauf ab, neue Sirt2-Wechselwirkungspartner mittels Chemoproteomik^[26] zu identifizieren und genomweite Bindungsprofile für Sirt2 durch Chem-seq^[27] zu erstellen. Unsere SirReal-Sonde stellt daher ein beispielloses und äußerst vielseitiges Werkzeug dar, das über eine ausgezeichnete Isotypselektivität und hohe Affinität zum Zielenzym Sirt2 verfügt. Sie kann nun verwendet werden, um die Biologie von Sirt2 und dessen Eignung als Angriffspunkt für Arzneistoffe auf eine bislang nicht mögliche Art und Weise zu untersuchen.

Danksagung

Wir danken der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für Unterstützung (Ju295/8-1, Si868/6-1, SFB992: A04 & Z02), K. Schmidkunz für ihre Assistenz bei den Zellkulturrexperimenten und E. Jung für die Erstellung der Inhaltsverzeichnisgraphik. J.O. wurde unterstützt durch den Hungarian National Scientific Research Fund (Grants OTKA T-101039 und T-112144).

Stichwörter: Desacylasen · Proteinmodifikationen · Proteomik · Sirtuine · Wirkstoffentwicklung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2252–2256
Angew. Chem. **2016**, *128*, 2293–2297

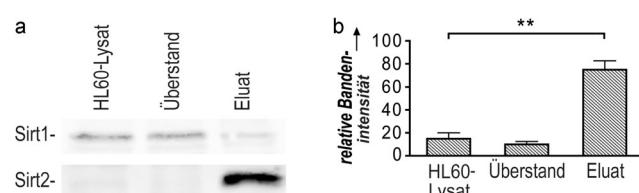


Abbildung 4. Die SirReal-Sonde (**11**) extrahiert Sirt2 aus HL60-Lysaten. a) Western-Blot-Analyse der an Dynabeads-MyOne-Streptavidin T1 gebundenen SirReal-Sonde, nach Inkubation mit HL60-Lysaten. Sirt1 und Sirt2 wurden durch isotypspezifische Antikörper nachgewiesen (vollständige Blots in Abbildung S7d,e). b) Quantifizierung der Banden des Western-Blots. Das Affinitäts-Pull-Down-Experiment führte zu einer signifikanten Anreicherung von Sirt2 ($n=3$). Statistik (t-Test): ** $p \leq 0,005$

- [1] a) S. Imai, C. M. Armstrong, M. Kaeberlein, L. Guarente, *Nature* **2000**, *403*, 795–800; b) A. Vaquero, M. B. Scher, D. H. Lee, A. Sutton, H. L. Cheng, F. W. Alt, L. Serrano, R. Sternglanz, D. Reinberg, *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1256–1261.
- [2] H. Vaziri, S. K. Dessain, E. N. Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente, R. A. Weinberg, *Cell* **2001**, *107*, 149–159.
- [3] F. Yeung, J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye, M. W. Mayo, *EMBO J.* **2004**, *23*, 2369–2380.
- [4] B. J. North, B. L. Marshall, M. T. Borra, J. M. Denu, E. Verdin, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 437–444.
- [5] B. J. North, M. A. Rosenberg, K. B. Jeganathan, A. V. Hafner, S. Michan, J. Dai, D. J. Baker, Y. Cen, L. E. Wu, A. A. Sauve, J. M. van Deursen, A. Rosenzweig, D. A. Sinclair, *EMBO J.* **2014**, *33*, 1438–1453.
- [6] J. L. Feldman, J. Baeza, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 31350–31356.
- [7] J. Du, Y. Zhou, X. Su, J. J. Yu, S. Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J. H. Kim, B. H. Choi, B. He, W. Chen, S. Zhang, R. A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao, H. Lin, *Science* **2011**, *334*, 806–809.
- [8] J. Du, H. Jiang, H. Lin, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2878–2890.
- [9] J. Schemies, U. Uciechowska, W. Sippl, M. Jung, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 861–889.
- [10] R. M. de Oliveira, J. Sarkander, A. G. Kazantsev, T. F. Outeiro, *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 82.
- [11] B. Beirowski, J. Gustin, S. M. Armour, H. Yamamoto, A. Viader, B. J. North, S. Michan, R. H. Baloh, J. P. Golden, R. E. Schmidt, D. A. Sinclair, J. Auwerx, J. Milbrandt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E952–E961.
- [12] T. F. Pais, E. M. Szego, O. Marques, L. Miller-Fleming, P. Antas, P. Guerreiro, R. M. de Oliveira, B. Kasapoglu, T. F. Outeiro, *EMBO J.* **2013**, *32*, 2603–2616.
- [13] a) H. S. Kim, A. Vassilopoulos, R. H. Wang, T. Lahusen, Z. Xiao, X. Xu, C. Li, T. D. Veenstra, B. Li, H. Yu, J. Ji, X. W. Wang, S. H. Park, Y. I. Cha, D. Gius, C. X. Deng, *Cancer Cell* **2011**, *20*, 487–499; b) L. Serrano, P. Martinez-Redondo, A. Marazuela-Duque, B. N. Vazquez, S. J. Dooley, P. Voigt, D. B. Beck, N. Kane-Goldsmith, Q. Tong, R. M. Rabanal, D. Fondevila, P. Munoz, M. Kruger, J. A. Tischfield, A. Vaquero, *Genes Dev.* **2013**, *27*, 639–653.
- [14] a) M. H. Yang, G. Laurent, A. S. Bause, R. Spang, N. German, M. C. Haigis, K. M. Haigis, *Mol. Cancer Res.* **2013**, *11*, 1072–1077; b) P. Y. Liu, N. Xu, A. Malyukova, C. J. Scarlett, Y. T. Sun, X. D. Zhang, D. Ling, S. P. Su, C. Nelson, D. K. Chang, J. Koach, A. E. Tee, M. Haber, M. D. Norris, C. Toon, I. Rooman, C. Xue, B. B. Cheung, S. Kumar, G. M. Marshall, A. V. Biankin, T. Liu, *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 503–514.
- [15] H. A. Eskandarian, F. Impens, M. A. Nahori, G. Soubigou, J. Y. Coppee, P. Cossart, M. A. Hamon, *Science* **2013**, *341*, 1238858.
- [16] a) J. S. Disch, G. Evindar, C. H. Chiu, C. A. Blum, H. Dai, L. Jin, E. Schuman, K. E. Lind, S. L. Belyanskaya, J. Deng, F. Coppo, L. Aquilani, T. L. Graybill, J. W. Cuozzo, S. Lavu, C. Mao, G. P. Vlasuk, R. B. Perni, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3666–3679; b) H. Cui, Z. Kamal, T. Ai, Y. Xu, S. S. More, D. J. Wilson, L. Chen, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8340–8357; c) K. Yamagata, Y. Goto, H. Nishimatsu, J. Morimoto, R. Ishitani, N. Dohmae, N. Takeda, R. Nagai, I. Komuro, H. Suga, O. Nureki, *Structure* **2014**, *22*, 345–352.
- [17] T. Rumpf, M. Schiedel, B. Karaman, C. Roessler, B. J. North, A. Lehoczky, J. Olah, K. I. Ladwein, K. Schmidkunz, M. Gajer, M. Pannek, C. Steegborn, D. A. Sinclair, S. Gerhardt, J. Ovadi, M. Schutkowski, W. Sippl, O. Einsle, M. Jung, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6263.
- [18] a) D. Urankar, J. Kosmrlj, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 981–985; b) M. Krasavin, R. Karapetian, I. Konstantinov, Y. Gezentsvey, K. Bukhryakov, E. Godovsky, O. Soldatkina, Y. Lavrovsky, A. V. Sosnov, A. A. Gakh, *Arch. Pharm.* **2009**, *342*, 420–427; c) N. D. Obushak, V. S. Matiichuk, R. Y. Vasylyshin, Y. V. Ostapuk, *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40*, 383–389.
- [19] S. I. Zav'yalov, N. E. Kravchenko, G. I. Ezhova, L. B. Kulikova, A. G. Zavozin, O. V. Dorofeeva, *Pharm. Chem. J.* **2007**, *41*, 105–108.
- [20] a) R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc. London* **1961**, 357–396; b) T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [21] B. Heltweg, J. Trapp, M. Jung, *Methods* **2005**, *36*, 332–337.
- [22] A. Basavapatruni, L. Jin, S. R. Daigle, C. R. Majer, C. A. Therkelsen, T. J. Wigle, K. W. Kuntz, R. Chesworth, R. M. Pollock, M. P. Scott, M. P. Moyer, V. M. Richon, R. A. Copeland, E. J. Olhava, *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *80*, 971–980.
- [23] Y. N. Cen, J. N. Falco, P. Xu, D. Y. Youn, A. A. Sauve, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 987–993.
- [24] J. Schiebel, N. Radeva, H. Koster, A. Metz, T. Krotzky, M. Kuhnert, W. E. Diederich, A. Heine, L. Neumann, C. Atmanene, D. Roecklin, V. Vivat-Hannah, J. P. Renaud, R. Meinecke, N. Schlinck, A. Sitte, F. Popp, M. Zeeb, G. Klebe, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1511–1521.
- [25] R. J. Hall, P. N. Mortenson, C. W. Murray, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2014**, *116*, 82–91.
- [26] M. Bantscheff, G. Drewes, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1973–1978.
- [27] L. Anders, M. G. Guenther, J. Qi, Z. P. Fan, J. J. Marineau, P. B. Rahl, J. Loven, A. A. Sigova, W. B. Smith, T. I. Lee, J. E. Bradner, R. A. Young, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 92–96.

Eingegangen am 21. Oktober 2015

Online veröffentlicht am 21. Dezember 2015