

# **Detektion und Charakterisierung von Sirtuin 1- modulierenden Naturstoffen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

M. Sc. Susanne Holzhauser  
aus Altötting

Februar 2013

Diese Arbeit wurde in der Zeit von September 2008 bis Februar 2013 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin in der Arbeitsgruppe Nutrigenomics and Gene Regulation unter der Leitung von Dr. Sascha Sauer angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Sascha Sauer

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Freie Universität Berlin

Disputation am 22.04.2013

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mir im Verlauf meiner Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden und zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Sascha Sauer für die Ermöglichung der Promotion in seiner Arbeitsgruppe und für die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsbedingungen. Die wertvollen fachlichen Diskussionen sowie seine konstruktiven Ratschläge im Rahmen der Planung und Durchführung dieser Arbeit haben wesentlich zum Erfolg derselben beigetragen.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Matthias F. Melzig für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken, aber auch für seine wertvollen Ratschläge und die mir entgegengebrachte Unterstützung.

Auch meinen Kollegen danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Anja Freiwald, Radmila Feldmann und Dr. Christopher Weidner für deren Unterstützung sowie für die zahlreichen und oft aufschlussreichen, fachlichen Diskussionen. Weiterhin danke ich Annabell Witzke, Beata Łukaszewska-McGreal, Claudia Quedenau, Chung-Ting Han und Magdalena Kliem für ihre Unterstützung, aber auch all meinen anderen Kollegen danke ich für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Gerd Multhaupt und seine Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie der FU Berlin. Dabei möchte ich insbesondere Dr. Chris Weise sehr herzlich für seine tatkräftige Unterstützung danken.

Besonders erwähnen möchte ich nochmals Radmila Feldmann, die über die letzten Jahre viele aufmunternde Worte für mich bereit hatte und mir eine gute Freundin geworden ist.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Yvonne Schichowski, die immer ein offenes Ohr für mich hatte. Mein uneingeschränkter Dank gilt Thomas Cichon, für seine Geduld, die zahlreichen Ermutigungen und den Rückhalt, den er mir über die letzten Jahre gewährt hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Altern und altersbedingte Erkrankungen	1
1.1.1	<i>Ursachen und Folgen altersbedingter Erkrankungen</i>	2
1.1.2	<i>Präventionsmaßnahmen</i>	3
1.1.3	<i>Lebensstil und Gesundheit</i>	3
1.1.3.1	Ernährung und Genexpression	3
1.1.3.2	Acetylierungsstatus von Proteinen	4
1.1.3.2.1	<i>Histonacetyltransferasen</i>	4
1.1.3.2.2	<i>Histondeacetylasen</i>	5
1.2	<b>Sirtuin 1</b>	<b>6</b>
1.2.1	<b>Charakterisierung</b>	<b>6</b>
1.2.2	<b>Biologische Bedeutung</b>	<b>7</b>
1.2.2.1	Lebensverlängerung	7
1.2.2.2	Stoffwechsel und altersbedingte Erkrankungen	7
1.2.3	<b>Struktur und Reaktionsmechanismus</b>	<b>9</b>
1.2.4	<b>Regulation der Sirtuin 1-Aktivität</b>	<b>12</b>
1.2.4.1	Endogene Regulation	13
1.2.4.1.1	<i>SIRT1-Expression</i>	13
1.2.4.1.2	<i>Spleißvarianten</i>	13
1.2.4.1.3	<i>Posttranslationale Modifikationen</i>	14
1.2.4.1.4	<i>NAD<sup>+</sup>- und Nicotinamid-Verfügbarkeit</i>	14
1.2.4.1.5	<i>Proteininteraktionen</i>	16
1.2.4.2	Exogene Regulation	16
1.2.4.2.1	<i>Inhibierende kleine Moleküle</i>	16
1.2.4.2.2	<i>Aktivierende kleine Moleküle</i>	19
1.3	<b>Screening auf Sirtuin 1-Modulatoren</b>	<b>23</b>
1.3.1	<b>Naturstoffe vs. synthetische Stoffe</b>	<b>24</b>
1.3.2	<b>Detektionsmethoden</b>	<b>25</b>
1.4	<b>Massenspektrometrie</b>	<b>26</b>
1.4.1	<b>MALDI-TOF MS Prinzip</b>	<b>27</b>
1.4.1.1	Ionenquelle	27
1.4.1.2	Massenanalysator	28
1.4.1.3	Detektor	28

<b>1.4.2</b>	<b><i>MALDI-TOF MS im Screeningverfahren</i></b>	<b>29</b>
1.4.2.1	Vorteile	29
1.4.2.2	Probleme	30
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>43</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>MALDI-TOF MS-basierte Methode</i></b>	<b>43</b>
3.2.1.1	SIRT1-Enzymreaktion	43
3.2.1.2	p300-Enzymreaktion	46
3.2.1.3	Peptid-Kalibrationskurve	47
3.2.1.4	Peptidaufreinigung	47
3.2.1.5	Probenpräparation	47
3.2.1.6	MALDI-TOF MS-Messung	48
3.2.1.7	Datenanalyse	49
3.2.1.8	Validierungsmethoden	51
<b>3.2.2</b>	<b><i>Fluor-de-Lys-Methode</i></b>	<b>52</b>
<b>3.2.3</b>	<b><i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion</i></b>	<b>53</b>
<b>3.2.4</b>	<b><i>Zellkultur</i></b>	<b>54</b>
3.2.4.1	Kultivierung und Subkultivierung verschiedener Zelllinien	54
3.2.4.2	Bestimmung der Zellproliferation	54
3.2.4.3	Quantifizierung der Proteinacetylierung mittels Western-Blot Analyse	55
3.2.4.3.1	<i>Zellbehandlung und -ernte</i>	55
3.2.4.3.2	<i>Zellyse und -fraktionierung</i>	56
3.2.4.3.3	<i>Bestimmung des Proteingehalts</i>	56
3.2.4.3.4	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	56
3.2.4.3.5	<i>Western-Blot und Proteindetektion</i>	56
3.2.4.3.6	<i>Datenanalyse</i>	58
3.2.4.4	Quantifizierung der TNF $\alpha$ -Freisetzung mittels ELISA	58
<b>3.2.5</b>	<b><i>Statistische Analyse</i></b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklung einer MALDI-TOF MS-basierten SIRT1-Screeningmethode</b>	<b>59</b>
<b>4.1.1</b>	<b><i>Peptidquantifizierung</i></b>	<b>59</b>

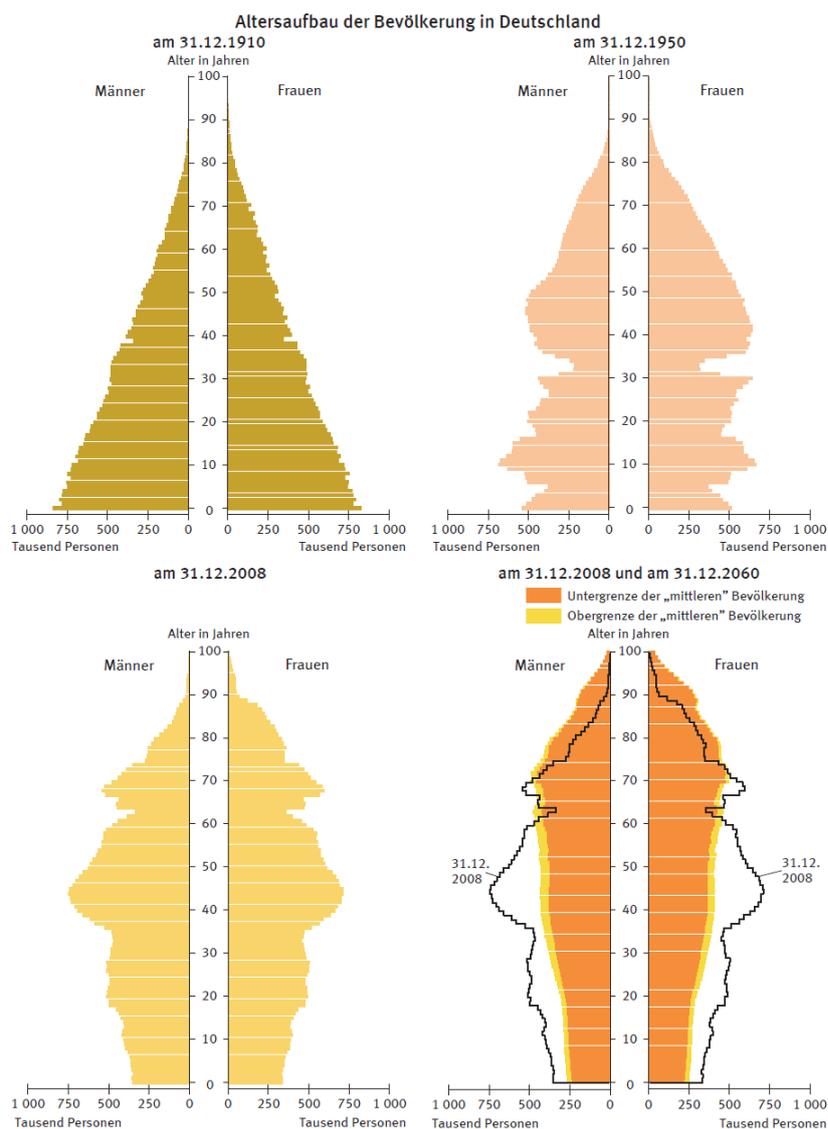
4.1.1.1	Optimierung der Präparationsbedingungen	60
4.1.1.2	Peptid-Kalibrationskurve	62
<b>4.1.2</b>	<b>Auswahl eines geeigneten Peptidsubstrates</b>	<b>64</b>
4.1.2.1	Detektion	64
4.1.2.2	Fluoreszenzmarkierung	65
4.1.2.2.1	Fluor-de-Lys Methode	65
4.1.2.2.2	MALDI-TOF Methode	66
<b>4.1.3</b>	<b>Optimierung der Peptidkonzentration</b>	<b>68</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Optimierung von Enzymkonzentration und Reaktionszeit</b>	<b>70</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Qualitätsprüfung der Screeningmethode</b>	<b>72</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Hochdurchsatz-Screening</b>	<b>74</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Bestimmung von <math>IC_{50}/EC_{50}</math>-Werten</b>	<b>76</b>
<b>4.2</b>	<b>Screening von Naturstoffen auf SIRT1-Modulatoren</b>	<b>79</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der SIRT1-Screeninghits</b>	<b>81</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Charakterisierung der SIRT1-Inhibitoren</b>	<b>81</b>
4.3.1.1	Bestimmung der Cytotoxizität	81
4.3.1.2	Bestimmung von $IC_{50}$ -Werten	82
4.3.1.3	Quantifizierung der p53-Acetylierung mittels Western-Blot	84
<b>4.3.2</b>	<b>Charakterisierung des artifiziellen SIRT1-Aktivators</b>	<b>86</b>
4.3.2.1	Bestimmung der Cytotoxizität	86
4.3.2.2	Bestimmung des $EC_{50}$ -Wertes	87
4.3.2.3	Quantifizierung der $TNF\alpha$ -Sekretion mittels ELISA	88
4.3.2.4	Eigenschaften in $HCO_3^-$ -haltigem $ddH_2O$	89
<b>4.4</b>	<b>Anwendbarkeit der MALDI-TOF MS-basierten Methode für p300</b>	<b>92</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Bestimmung von Enzymkonzentration und Reaktionszeit</b>	<b>93</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Bestimmung von <math>IC_{50}</math>-Werten</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>MALDI-TOF MS-basierte Methodenentwicklung</b>	<b>96</b>
5.1.1	Peptidquantifizierung	96
5.1.2	Art des Peptidsubstrates	100
5.1.3	Optimierung der Reaktionsparameter	102
5.1.4	Anwendungsgebiete der Methode	104
<b>5.2</b>	<b>Strukturelle Eigenschaften von SIRT1-Modulatoren</b>	<b>108</b>
5.2.1	Artifizielle SIRT1-Aktivatoren	108
5.2.2	SIRT1-Inhibitoren	111

<b>5.3</b>	<b>Zelluläre Effekte der SIRT1-Modulatoren</b> _____	<b>112</b>
<b>5.3.1</b>	<b><i>Bestimmung der Cytotoxizität</i></b> _____	<b>112</b>
<b>5.3.2</b>	<b><i>NP1-vermittelte Induktion der p53-Acetylierung</i></b> _____	<b>113</b>
<b>5.3.3</b>	<b><i>NP9-vermittelte Reduktion der TNF<math>\alpha</math>-Freisetzung</i></b> _____	<b>113</b>
<b>5.4</b>	<b>Schlussfolgerung</b> _____	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> _____	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> _____	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b> _____	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen</b> _____	<b>139</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> _____	<b>140</b>
<b>10.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> _____	<b>140</b>
<b>10.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> _____	<b>145</b>
<b>10.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> _____	<b>147</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Altern und altersbedingte Erkrankungen

Die Altersstruktur der deutschen Bevölkerung wird sich bis zum Jahr 2060 massiv verändern. Dies geht aus der 12. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung des Statistischen Bundesamtes hervor (Abbildung 1-1). (1)



**Abbildung 1-1: Altersaufbau der Bevölkerung in Deutschland (aus (1))**

Veränderung des Altersaufbaus der deutschen Bevölkerung vom klassischen Pyramidenmodell im Jahr 1910 hin zu einer Urnenform im Jahr 2060. (12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, Statistisches Bundesamt, 2009) (1)

Die klassische Alterspyramide, wie sie etwa im Jahr 1910 aktuell war, wurde im Verlauf der Jahre durch Ereignisse wie die Weltkriege und die Weltwirtschaftskrise zerklüftet. Seit einiger Zeit spiegelt sich aber vor allem ein deutlicher Rückgang in der Geburtenhäufigkeit wider. Betrachtet man den Trend bis zum Jahr 2060 so wird deutlich, dass es sich bei der deutschen Bevölkerung aufgrund der niedrigen Geburtenhäufigkeit und der steigenden Lebenserwartung um eine zunehmend alternde Gesellschaft handelt. (1) Diese Entwicklung ist jedoch nicht nur in Deutschland, sondern auch auf internationaler Ebene erkennbar. (2, 3)

Eine alternde Bevölkerung bringt mit sich, dass immer mehr Menschen mit dem Auftreten altersbedingter Erkrankungen konfrontiert sind, die oft chronisch verlaufen und irreversibel sind. Darunter fallen insbesondere Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und des Bewegungsapparates, aber auch Demenzen, Depressionen sowie Krebserkrankungen spielen eine große Rolle. (4) Da Menschen mit zunehmendem Alter insbesondere in der Bauchhöhle verstärkt Fettgewebe akkumulieren (5), treten zudem vermehrt dadurch begünstigte Folgeerkrankungen auf, wie Typ-2 Diabetes (5, 6) oder Arteriosklerose (4, 5).

### ***1.1.1 Ursachen und Folgen altersbedingter Erkrankungen***

Die Ursachen für die erhöhte Krankheitsprävalenz einer alternden Bevölkerung sind vielfältig. Neben altersphysiologischen Veränderungen von Organen und abnehmenden Immunantworten des Körpers spielen hierbei auch die langen Latenzzeiten bestimmter Erkrankungen (z. B. Krebs) oder das „Mitaltern“ bereits länger vorhandener Krankheiten eine wesentliche Rolle. Letztere können aufgrund ihrer Dauer schließlich Folgeerkrankungen auslösen. Aber auch Risikofaktoren, etwa Umweltgifte, Lärm, Rauchen oder ungesunde Ernährung, denen der Körper über Jahre hinweg ausgesetzt ist, können sich letztendlich nachteilig auf die Gesundheit auswirken. (4)

Da ältere Menschen häufig von mehreren chronischen Erkrankungen gleichzeitig betroffen sind, können sich daraus Einbußen in der unabhängigen Lebensführung, Selbstbestimmung und Lebensqualität ergeben. Durch den umfassenden Behandlungsbedarf (4) entstehen zudem enorme Kosten für das Gesundheitssystem (7, 8). Im Jahr 2008 etwa wurden in Deutschland die durchschnittlichen Krankheitskosten pro Kopf (rund 3.100 €) von der Altersgruppe

der 65- bis 84-Jährigen um mehr als das Doppelte (6.520 €), von den über 85-Jährigen hingegen um fast das Fünffache (14.840 €) überschritten. (7)

### **1.1.2 Präventionsmaßnahmen**

Sowohl die beschriebenen sozialen als auch die massiven wirtschaftlichen Probleme sind daher Argumente für eine Prävention altersbedingt auftretender Erkrankungen. Prävention umfasst dabei nicht nur die Vorbeugung von Erkrankungen, sondern auch die Vorbeugung von Verschlechterungen des Gesundheitszustandes. Wichtige Einflussgrößen auf die Krankheitsentstehung im Alter sind konstante Faktoren (z. B. genetische Prädisposition), altersphysiologische Veränderungen (z. B. hormonelle Veränderungen), sowie variable Faktoren. Letztere beinhalten etwa Umwelteinflüsse und persönliche Verhaltensweisen und sind, da darauf am besten Einfluss genommen werden kann, Hauptangriffspunkte bei der Prävention. Um Krankheiten im Alter effektiv vorzubeugen, muss demzufolge vor allem Verhaltensweisen mit negativem Einfluss auf die Gesundheit (z. B. Rauchen, Alkoholkonsum, mangelnde körperliche Aktivität, unausgewogene Ernährung, unregelmäßige Einnahme von Medikamenten) entgegengesteuert werden. (9)

### **1.1.3 Lebensstil und Gesundheit**

Der Lebensstil übt großen Einfluss auf den menschlichen Gesundheitszustand aus. (6) Die Mechanismen, durch welche Lebensstilfaktoren wie Sport und Ernährung die Gesundheit beeinflussen können, sind heutzutage Gegenstand intensiver Forschung. (10, 11) So befasst sich etwa das Gebiet der Ernährungsforschung mit der Prävention chronischer Erkrankungen. (10)

#### **1.1.3.1 Ernährung und Genexpression**

Ob eine Krankheit sich entwickelt oder nicht ist unter anderem das Ergebnis komplexer intrazellulärer (Gen-) Regulationsmechanismen. (12) Der Forschungsbereich über den Einfluss der Ernährung auf die Genexpression trägt die Bezeichnung „Nutrigenomik“. (13)

Bei der Steuerung der Genexpression spielen posttranslationale Modifikationen diverser Proteine eine entscheidende Rolle. Die Histonproteine, um welche die DNA gewunden ist, können beispielsweise methyliert, acetyliert oder

phosphoryliert werden. Dadurch wird geregelt, ob sich das Chromatin in einem kompakten und damit nicht ablesbaren Zustand befindet (Heterochromatin) oder ob es in einem lockeren, für Transkriptionsfaktoren gut zugänglichen Zustand vorliegt (Euchromatin). (14) Aber auch Transkriptionsfaktoren selbst können durch posttranslationale Modifikationen in ihrer Aktivität beeinflusst werden. (15)

Diese posttranslationalen Modifikationen werden von spezifischen Enzymen katalysiert. Durch Regulation dieser Enzyme können diverse bioaktive Nahrungsbestandteile in die beschriebenen Genregulationsmechanismen eingreifen. (16, 17)

#### 1.1.3.2 Acetylierungsstatus von Proteinen

Die Acetylierung von Proteinen an der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins (18) stellt eine reversible, posttranslationale Modifikation dar, durch die neben der Genregulation auch eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse kontrolliert wird. Der Acetylierungszustand eines Proteins wird durch zwei Enzymklassen beeinflusst: Histonacetyltransferasen (HATs) bewirken die Übertragung einer Acetylgruppe auf ein Protein, welche durch Histondeacetylasen (HDACs) wieder entfernt werden kann. (18, 19) Die ersten bekannten Zielproteine dieser Enzymklassen waren die Histone. (18) Mittlerweile ist bekannt, dass auch viele andere Proteine durch HATs und HDACs modifiziert werden, etwa Transkriptionsfaktoren (18, 19) wie p53 (20, 21) oder NF $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells*) (22, 23).

##### 1.1.3.2.1 Histonacetyltransferasen

HATs acetylieren diverse Proteine, indem sie den Acetylrest des Cofaktors Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins übertragen. Sie werden aufgrund ihrer zellulären Lokalisierung in Typ A (nucleär) und Typ B (cytosolisch) unterteilt. (24, 25) Die Gruppe der nucleären HATs ist sehr heterogen und wird basierend auf Strukturhomologie und biochemischen Acetylierungsmechanismen wiederum in fünf Subklassen (GNAT, p300/CBP, MYST, mit Transkriptionsfaktoren verwandte HATs, Coaktivatoren von Kernrezeptoren) gegliedert. Während die zentrale Kernregion der Enzyme, die den Cofaktor Acetyl-CoA bindet, strukturell konserviert ist, unterscheiden sich die HATs in ihren N- und C-terminalen Enden. Letzteres stellt eine Erklärung für das breite Substratspektrum der HATs dar, da

diese Regionen mit Substraterkennung und -spezifität in Verbindung gebracht werden. (25)

Eine interessante Rolle innerhalb der HATs nimmt der transkriptionale Coaktivator p300 ein. Er reguliert die Gentranskription auf unterschiedliche Weisen: durch Acetylierung von Histonen und/oder Transkriptionsfaktoren, durch Ausbildung eines Gerüsts für mehrere Transkriptionsfaktoren am Chromatin sowie durch Verbindung von Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie. (26) Die HAT-Domäne von p300 weist im Vergleich zu anderen HATs einige strukturelle Besonderheiten mit Einfluss auf die Acetyltransferasereaktion auf. Zum einen existiert eine lange Schleife (L1), die umfassende Interaktionen mit dem CoA-Teil eines Lys-CoA-Inhibitors eingeht. Zum anderen befindet sich in unmittelbarer Nähe der Lysin-Bindungstasche eine weitere Tasche, die aufgrund ihrer hohen Elektronegativität basische Aminosäurereste erkennt und somit für die Substratspezifität von p300 mitverantwortlich ist. (27) Die enzymatische Aktivität von p300 kann auf verschiedene Arten reguliert werden, etwa durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung, aber auch durch Veränderung der zellulären Lokalisation. (26) Ein spezieller Aktivierungsmechanismus ist die intermolekulare Autoacetylierung einer Aktivierungsschleife von p300. (28) Ist die Schleife gering acetyliert, bindet sie vermutlich an dem negativ geladenen Teil der HAT-Domäne und inhibiert sie auf diese Weise. (27) Durch Hyperacetylierung der Schleife wird die inhibierende Bindung aufgelöst und die Bindungsstelle für andere Substrate freigegeben. (28, 29)

#### 1.1.3.2.2 Histondeacetylasen

HDACs bilden durch ihre Deacetylaseaktivität den mechanistischen Gegenspieler zu den HATs. (19) Auf Basis phylogenetischer Analysen werden sie in vier Klassen unterteilt. Die Klassen I (HDACs 1, 2, 3, HDAC 8), II (HDACs 4, 5, 7, 9, HDACs 6, 10) und IV (HDAC 11) umfassen die  $Zn^{2+}$ -abhängigen HDACs. (19, 30) Ihr Deacetylierungsmechanismus beruht auf einer  $Zn^{2+}$ -vermittelten Hydrolyse des Acetyllysins. (19, 31) Die Klasse III wird von den Sirtuinen (SIRTs) gebildet, deren Reaktionsmechanismus von dem Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $NAD^+$ ) abhängig ist. (19)

Auch die SIRTs werden phylogenetisch in vier Klassen untergliedert. (32) Sie unterscheiden sich sowohl bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisierung als auch hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität (Tabelle 1-1). (33)

**Tabelle 1-1: Phylogenetische, funktionale und lokale Einteilung der Sirtuine** (nach (33))

Klasse	Sirtuine	Mechanismus	Lokalisierung
I	SIRT1	Deacetylierung	Nucleus, Cytosol
	SIRT2		Cytosol
	SIRT3		Mitochondrien
II	SIRT4	ADP-Ribosylierung	Mitochondrien
III	SIRT5	Deacetylierung, Demalonylierung, Desuccinylierung	Mitochondrien
IV	SIRT6	Deacetylierung, ADP-Ribosylierung	Nucleus
	SIRT7	Unbekannt	Nucleolus

## 1.2 Sirtuin 1

### 1.2.1 Charakterisierung

SIRT1 ist eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Histondeacetylase (s. 1.1.3.2) (19) und stellt das am umfassendsten untersuchte humane Sirtuin dar. (33) Es ist das Homolog des *sir2* (*silent information regulator 2*) in Hefe. (34, 35) SIRT1 ist sowohl im Zellkern als auch im Cytosol lokalisiert und deacetyliert eine ganze Reihe unterschiedlicher Zielproteine. Zu diesen zählen neben den namensgebenden Histonen auch Nicht-Histon-Proteine, wie z. B. der Transkriptionsfaktor p53. Durch die Deacetylierung von Zielproteinen kann SIRT1 Einfluss auf diverse Stoffwechselwege nehmen. Zahlreiche Studien liefern Hinweise auf SIRT1-vermittelte, positive Gesundheitseffekte, weshalb großes Interesse in der Regulation der enzymatischen Aktivität von SIRT1 besteht. (33) Nachfolgend wird deshalb die Biologie dieses Enzyms umfassend dargestellt.

## 1.2.2 *Biologische Bedeutung*

### 1.2.2.1 Lebensverlängerung

Unter Kalorienrestriktion versteht man eine um 20-50% reduzierte Kalorienaufnahme (33), allerdings unter ausreichender Aufnahme der essentiellen Nahrungsinhaltsstoffe. (36) In einer Reihe von Lebewesen, wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, konnte gezeigt werden, dass sich eine Kalorienrestriktion verlängernd auf die Lebensspanne auswirkt. (37-39) Zudem wurden die Homologe des SIRT1 dieser Organismen mit einer erhöhten Lebensspanne in Verbindung gebracht. (39-41) In einigen Lebewesen wurde schließlich durch Gen-Knockout gezeigt, dass die SIRT1-Homologe an dem durch Kalorienrestriktion ausgelösten Signalweg für Langlebigkeit beteiligt sind. (37, 42) Allerdings sind die Resultate bezüglich der Sirtuine derzeit stark umstritten. Neuere Studien belegen, dass viele der beobachteten Effekte durch den Einsatz ganz bestimmter Hefestämme bzw. durch die Verwendung unzureichender Kontrollstämme bei Fadenwurm und Fliege begünstigt wurden. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte konnten die Effekte nicht oder nur in geringerem Ausmaß reproduziert werden. (43-45)

Auch in Mäusen wird durch Kalorienrestriktion eine Verlängerung der Lebensspanne hervorgerufen (46, 47), jedoch ist auch in diesem Organismus eine direkte Beteiligung von SIRT1 an diesem Prozess nicht eindeutig (48-50). Allerdings konnte durch SIRT1-Überexpression der Gesundheitszustand von Mäusen deutlich verbessert (49, 50), und so das Auftreten altersbedingter Erkrankungen reduziert werden (50).

### 1.2.2.2 Stoffwechsel und altersbedingte Erkrankungen

In zahlreichen Studien konnte bislang ein positiver Einfluss von SIRT1 auf das Stoffwechselgleichgewicht und dadurch auch auf die Reduktion altersbedingter Erkrankungen nachgewiesen werden.

Beispielsweise kann SIRT1 der Entwicklung einer Insulinresistenz sowie eines Typ-2 Diabetes entgegenwirken. Durch Deacetylierung der Faktoren PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  Coaktivator-1 $\alpha$ ) (51), CRTC2 (CREB regulierter transkriptionaler Coaktivator 2) und FOXO1 (*forkhead box, sub-group O1*) kann die

Glucosehomöostase reguliert werden (52). Daneben kann durch Reprimierung der *UCP2*- (Entkopplungsprotein 2-) Expression die Insulinsekretion in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen (53) und durch eine verminderte *PTP1B*- (Protein-Tyrosin Phosphatase 1B-) Expression die Insulinsensitivität in Muskel und Leber gesteigert werden (54).

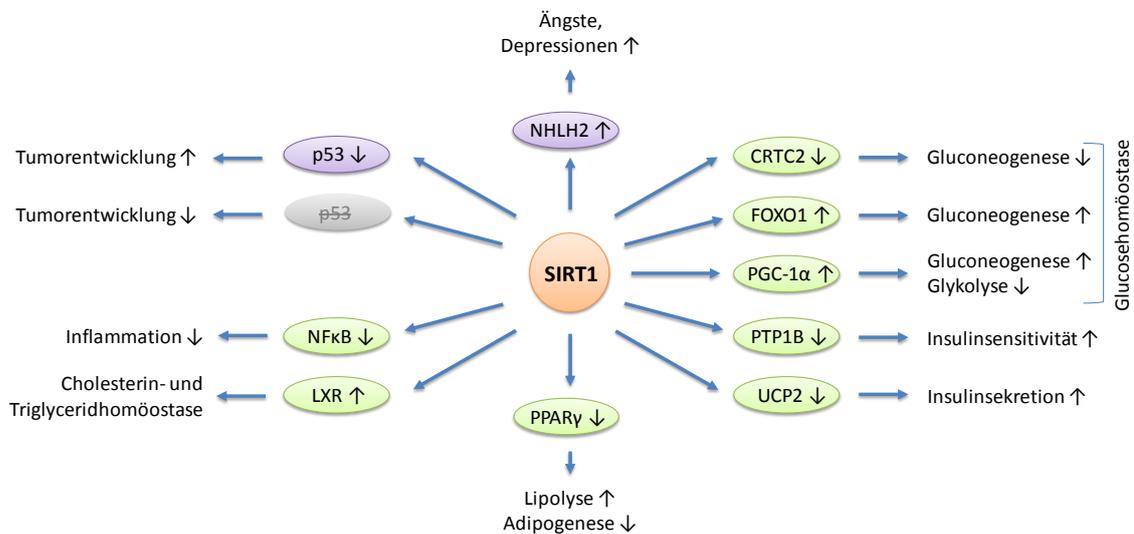
Das Risiko für die Entwicklung metabolischer Komplikationen, wie Typ-2 Diabetes oder Arteriosklerose, wird mit einer vermehrten Akkumulation von insbesondere viszeralem weißem Fettgewebe im Verlauf des Alterns in Verbindung gebracht. (5) SIRT1 unterdrückt den Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  (Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ ) durch Bindung an dessen Cofaktoren NCoR (nuklearer Rezeptor Corepressor) und SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*). Dies resultiert in reduzierter Adipogenese und gesteigerter Lipolyse in weißen Adipocyten. (55)

Das Krankheitsbild der Arteriosklerose wird auch durch LXR (Leber-X-Rezeptor) und NF $\kappa$ B beeinflusst. (56) Beide Transkriptionsfaktoren werden durch SIRT1 deacetyliert. (22, 57) LXR wird dadurch aktiviert und reguliert die Cholesterin- und Triglyceridhomöostase (57), während NF $\kappa$ B inaktiviert wird und infolgedessen Entzündungsreaktionen abnehmen (56). Letzteres kann sich auch neuroprotektiv bei der Amyloid- $\beta$ -vermittelten Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen auswirken. (58)

Während sich SIRT1 auf die eben genannten Krankheitsbilder positiv auswirkt, ist dessen Rolle in der Krebsentstehung nicht eindeutig. Einerseits kann SIRT1 onkogen wirken, indem es den Tumorsuppressor p53 deacetyliert und somit inhibiert. Andererseits wurde gezeigt, dass SIRT1 bei mutiertem p53 tumorsuppressiv agieren kann. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Rolle von SIRT1 in der Krebsentwicklung abhängig von den genetischen Veränderungen im Verlauf der Tumorentstehung ist. (59)

Ein weiteres Zielprotein von SIRT1 stellt der Transkriptionsfaktor NHLH2 (*nescient helix-loop-helix 2*) dar. Durch eine SIRT1-vermittelte Deacetylierung wird NHLH2 aktiviert, was wiederum zu einer vermehrten Expression von MAO-A (Monoaminoxidase A) und infolgedessen zu einem verstärkten Abbau von Serotonin führt. Dies kann zur Entwicklung von Ängsten und Depressionen beitragen. (60)

In Abbildung 1-2 sind die beschriebenen, durch SIRT1 regulierten Stoffwechselwege in einer Übersicht dargestellt:



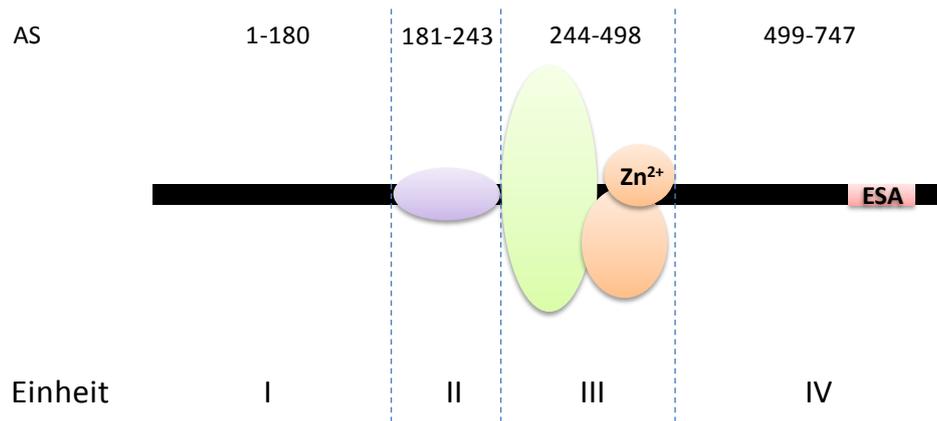
**Abbildung 1-2: Regulation verschiedener Stoffwechselwege durch SIRT1**

SIRT1 kann durch die Regulation diverser Faktoren (CRT2, FOXO1, PGC-1 $\alpha$ , PTP1B, UCP2, PPAR $\gamma$ , LXR, NF $\kappa$ B) einen positiven Effekt (grün) auf unterschiedliche Stoffwechselwege (Glucose-, Insulin-, Fettstoffwechsel, Inflammation) ausüben, und auf diese Weise zu einer Reduktion altersbedingter Erkrankungen beitragen. Dagegen kann SIRT1 über andere Faktoren (NHLH2, p53) auch negative Gesundheitseffekte (lila), wie die Entstehung von Ängsten oder Tumoren, begünstigen. Ob der Einfluss von SIRT1 auf die Tumorentstehung positiv oder negativ ist, hängt möglicherweise von den genetischen Modifikationen der jeweiligen Krebszelle ab. CRT2: CREB regulierter transkriptionaler Koaktivator 2; FOXO1: *forkhead box, sub-group O1*; LXR: Leber-X-Rezeptor; NF $\kappa$ B: *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells*; NHLH2: *nescient helix-loop-helix 2*; PGC-1 $\alpha$ : PPAR $\gamma$  Coaktivator-1 $\alpha$ ; PPAR $\gamma$ : Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ ; PTP1B: Protein-Tyrosin Phosphatase 1B; UCP2: Entkopplungsprotein 2.

### 1.2.3 Struktur und Reaktionsmechanismus

Die bekannten Informationen zur Struktur und Funktionalität von Sirtuinen beruhen unter anderem auf Kristallstrukturen von SIRT2 (*Homo sapiens*) (61-63), yHst2 (*Saccharomyces cerevisiae*) (62, 64), sowie von Sir2-Af1 (62, 63, 65) und Sir2-Af2 (63, 66, 67) (*Archaeoglobus fulgidus*). Trotz der erfolgreichen Kristallisation des Enzyms SIRT1 (Aminosäuren (AS) 140-747) im Jahr 2011 ist eine genaue strukturelle Analyse dieser Daten noch nicht verfügbar. (68) Die Struktur von SIRT1 wurde daher mittels computergestützter Modelle auf Basis anderer

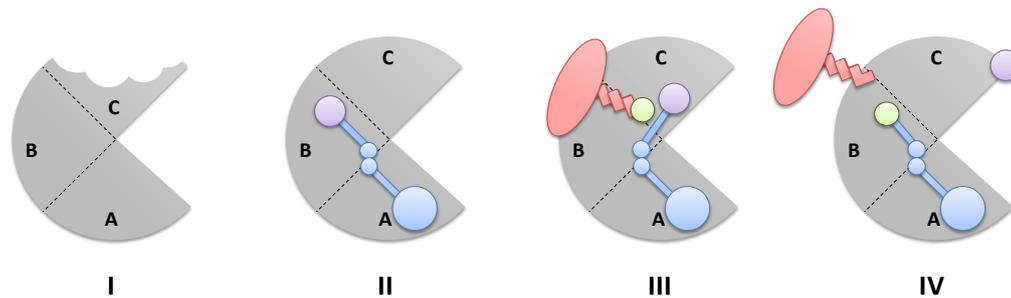
Sirtuinkristalle generiert. (62, 63) Demnach wird das Enzym SIRT1 in vier Regionen untergliedert: in den N-Terminus (AS 1-180), die allosterische Bindungsstelle (AS 181-243), den katalytischen Kern (AS 244-498) und den C-Terminus (AS 499-747). Die allosterische Bindungsstelle und der katalytische Kern bilden kompakte, kugelförmige Strukturen, während die beiden Termini unstrukturiert vorliegen (Abbildung 1-3). (62)



**Abbildung 1-3: Struktur von SIRT1**

**I:** N-Terminus (AS 1-180); **II:** allosterische Bindungsstelle (AS 181-243); **III:** katalytischer Kern mit großer Domäne (Rossmann-Falte; grün) und kleiner Subdomäne (helikale und Zink-bindende Domäne; orange) (AS 244-498); **IV:** C-Terminus (AS 499-747) mit ESA. ESA: *essential for SIRT1 activity*.

Eine zentrale Rolle nimmt der **katalytische Kern** ein, in welchem die Deacetylierung der Substrate stattfindet. Er besteht aus einer großen Domäne, die eine Rossmann-Faltung ausbildet (62), und einer kleinen Subdomäne, die sich aus einer helikalen sowie einer Zn<sup>2+</sup>-bindenden Struktur zusammensetzt. Zwischen großer und kleiner Domäne liegt die aktive Stelle des Enzyms. Dort bindet sowohl das acetylierte Substrat als auch der Cofaktor NAD<sup>+</sup>. Die NAD<sup>+</sup>-Bindungstasche ist in die Taschen A, B und C unterteilt (Abbildung 1-4). (63)

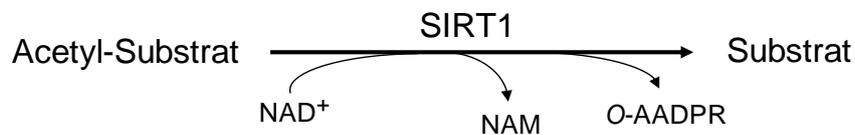


**Abbildung 1-4: NAD<sup>+</sup>-Bindungstasche, unterteilt in die Taschen A, B und C**

**I:** ohne Bindungspartner und mit teilweise unstrukturierter „flexibler Schleife“ der C-Tasche; **II:** mit nicht-produktivem NAD<sup>+</sup>-Komplex (blau-lila) und strukturierter „flexibler Schleife“ der C-Tasche; **III:** mit produktivem NAD<sup>+</sup>-Komplex (blau-lila) und acetyliertem Substrat (rot-grün); **IV:** mit abgespaltenem NAM (lila), deacetyliertem Substrat (rot) und O-AADPR (blau-grün). NAD: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; NAM: Nicotinamid; O-AADPR: O-Acetyl-ADP-Ribose.

Die C-Tasche beinhaltet eine Region, die eine hohe Flexibilität aufweist („flexible Schleife“) und die Vorderwand der C-Tasche bildet. Ist kein NAD<sup>+</sup>-Molekül gebunden, so liegt diese „flexible Schleife“ teilweise ungeordnet vor (Abbildung 1-4; **I**). Bindet NAD<sup>+</sup> in der NAD<sup>+</sup>-Bindungstasche, so ist es in den Taschen A und B positioniert. Durch diesen Bindungsvorgang nimmt die „flexible Schleife“ der C-Tasche eine geordnete Form ein (Abbildung 1-4; **II**). (66) Da in diesem Zustand kein acetyliertes Substrat binden kann, wird hierfür auch der Begriff „nicht-produktiver Komplex“ verwendet. In Kristallstrukturen mit einem Substratimitator hingegen bildet NAD<sup>+</sup> einen „produktiven Komplex“ mit dem Enzym. In diesem Zustand ist der Nicotinamid- (NAM-) Rest von NAD<sup>+</sup> in die C-Tasche eingebettet (Abbildung 1-4; **III**). Dadurch befindet sich das NAD<sup>+</sup> verglichen mit seinem Grundzustand in einer destabilisierten Lage. (67) In dieser Konformation finden schließlich die Abspaltung und Freisetzung von NAM sowie die Übertragung des Acetylrestes vom Substrat auf die ADP-Ribose statt (Abbildung 1-4; **IV**). (66) Dabei entsteht 2'-O-Acetyl-ADP-Ribose (2'-O-AADPR) (65), das ein chemisches Gleichgewicht mit 3'-O-AADPR bildet. (69) Kinetische Analysen bestätigen diesen sequentiellen Reaktionsmechanismus. Dieser besagt, dass erst nach Bindung von NAD<sup>+</sup> und acetyliertem Substrat der erste katalytische Schritt stattfinden kann, nämlich die Abspaltung von NAM. Anschließend erfolgt die Übertragung des Acetylrestes von dem Substrat auf die ADP-Ribose. Die Freisetzung der Produkte

beginnt mit NAM, gefolgt von dem deacetylierten Substrat und von O-AADPR in ungeordneter Reihenfolge (Abbildung 1-5). (70)



#### Abbildung 1-5: SIRT1-vermittelte Deacetylierungsreaktion

In der SIRT1-vermittelten Deacetylierungsreaktion binden zuerst der Cofaktor  $\text{NAD}^+$  und das acetylierte Substrat an das Enzym. Erst dann wird NAM von  $\text{NAD}^+$  abgespalten. Auf die verbleibende O-ADP-Ribose wird schließlich der Acetylrest des acetylierten Substrates übertragen. Dabei entsteht O-AADPR sowie das deacetylierte Substrat. NAD: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; NAM: Nicotinamid; O-AADPR: O-Acetyl-ADP-Ribose.

Die **allosterische Bindungsstelle** von SIRT1 dient der Bindung möglicher Enzymmodulatoren. Sie besteht aus vier  $\alpha$ -Helices und befindet sich zwischen dem N-Terminus und dem katalytischen Kern. Innerhalb der Bindungstasche sind fünf aromatische Reste von besonderem Interesse, die sich begünstigend auf die Bindung solcher Modulatoren auswirken könnten. Die benachbarte Lage der allosterischen Bindungsstelle zum katalytischen Kern ermöglicht eine Regulierung der enzymatischen Aktivität durch Konformationsänderungen. (62)

Der **N-** und der **C-Terminus** von SIRT1 liegen in ungeordneten Strukturen vor. Auch sie können Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben, etwa durch posttranslationale Modifikationen oder mögliche Bindung regulatorischer Proteine. (62) Außerdem wurde im C-Terminus eine Sequenz aus 25 Aminosäuren (AS 631-655) identifiziert, die essentiell für die Deacetylaseaktivität von SIRT1 (ESA; *essential for SIRT1 activity*) ist. ESA interagiert mit dem Deacetylasekern (AS 184-510) von SIRT1 und bewirkt vermutlich durch eine Konformationsänderung desselben, dass Substrate stärker an SIRT1 binden. (71)

#### 1.2.4 Regulation der Sirtuin 1-Aktivität

Wie bei der Strukturbeschreibung von SIRT1 bereits angedeutet, kann die Aktivität des Enzyms auf verschiedene Weisen verändert werden. So kann einerseits die Expression des Enzyms selbst auf mRNA- und auf Proteinebene reguliert werden, andererseits können aber auch andere Moleküle einen bedeutenden Einfluss auf

die enzymatische SIRT1-Aktivität ausüben. Generell kann man zwischen einer endogenen und einer exogenen Regulation unterscheiden.

#### 1.2.4.1 Endogene Regulation

##### 1.2.4.1.1 *SIRT1-Expression*

Eine wichtige Ebene für die Regulation der Enzymaktivität ist die der *SIRT1*-Expression. Diverse Transkriptionsfaktoren binden aufgrund bestimmter Stimuli an den *SIRT1*-Promotor und üben entweder eine reprimierende oder eine aktivierende Funktion auf die *SIRT1*-Expression aus. (33) Ein Beispiel hierfür sind die beiden Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP Response-Element Bindungsprotein) und ChREBP (Kohlenhydrat Response-Element Bindungsprotein). Beide konkurrieren um die Bindung an den *SIRT1*-Promotor in Abhängigkeit des Energiezustandes einer Zelle. In Mäusen mit verringerter Nahrungszufuhr wurde bedingt durch CREB in verschiedenen Geweben eine erhöhte SIRT1-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene beobachtet. Nach erneuter Fütterung der Mäuse bewirkte ChREBP eine schnelle Rückkehr zu den basalen Expressionswerten. (72) Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, die die *SIRT1*-Expression beeinflussen, sind Foxo3a und p53. Bei normaler Nährstoffversorgung wird die *SIRT1*-Expression durch p53 unterdrückt. Im Hungerzustand hingegen gelangt vermehrt Foxo3a in den Zellkern und geht eine Interaktion mit p53 ein, was zu einer erhöhten *SIRT1*-Expression führt. (73)

##### 1.2.4.1.2 *Spleißvarianten*

Die Entdeckung zweier alternativer Spleißvarianten von SIRT1 zeigt einen weiteren Weg auf, wie die Aktivität von SIRT1 modifiziert werden kann. Die alternative Spleißvariante SIRT1- $\Delta$ Exon8 hat verglichen mit SIRT1-FL (*SIRT1 full length*) eine nur sehr schwache Deacetylaseaktivität, was mit dem Fehlen eines Teils des katalytischen Kerns erklärt werden kann. (74) Einer weiteren Spleißvariante, SIRT1- $\Delta$ 2/9, fehlt der gesamte katalytische Kern, weshalb keine Deacetylaseaktivität vorhanden ist. (75) Stattdessen übernehmen die beiden Spleißvarianten überwiegend andere Funktionen innerhalb der Zelle. Beide Formen stehen in engem Zusammenhang mit p53: So kann einerseits der Spleißvorgang der SIRT1-Prä-mRNA für SIRT1- $\Delta$ Exon8 und SIRT1- $\Delta$ 2/9 durch

p53 negativ reguliert werden, während andererseits die p53-Expression durch die beiden SIRT1-Spleißvarianten kontrolliert werden kann. (74, 75)

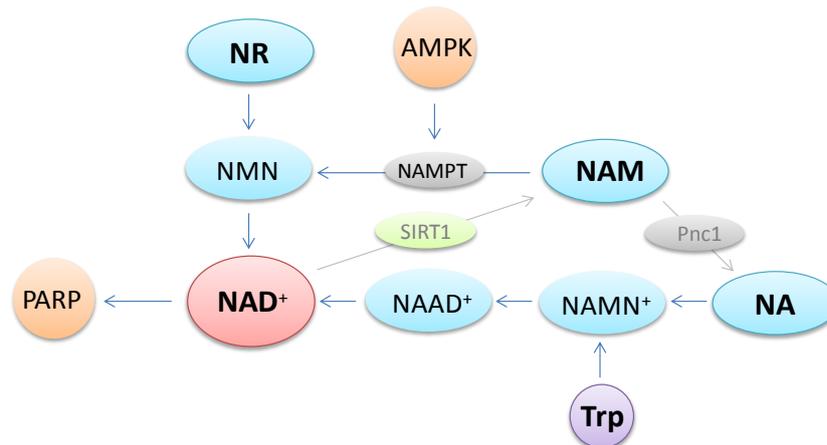
#### 1.2.4.1.3 Posttranslationale Modifikationen

Auch durch posttranslationale Modifikationen, wie SUMOylierung oder Phosphorylierung, kann die Aktivität von SIRT1 beeinflusst werden. (33) Sasaki *et al.* identifizierten 13 Phosphorylierungsstellen, die ausschließlich in den Termini von SIRT1 lokalisiert sind. (76) Diese wurden im Verlauf der Zeit noch um weitere Phosphorylierungsstellen ergänzt. (77, 78) Die Regulation der enzymatischen Aktivität anhand dieser Modifikationen kann auf unterschiedliche Art erfolgen. Beispielsweise phosphoryliert die Kinase JNK1 (cJUN N-terminale Kinase 1) unter oxidativem Stress SIRT1 an den Aminosäuren Ser27, Ser47 und Thr530. Dies führt zu einer gesteigerten Translokation von SIRT1 in den Zellkern sowie zu einer erhöhten Enzymaktivität, die allerdings spezifisch für das Substrat Histon H3 ist und nicht für p53. (79) Weiterhin wird SIRT1 durch DYRK1A (*dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A*) und DYRK3 an Thr522 phosphoryliert und dadurch aktiviert. (78) Diese Modifikation bewirkt, dass SIRT1 sich nicht zu Oligomeren zusammenlagert, sondern als Monomer in einem aktiveren Zustand vorliegt. (80)

#### 1.2.4.1.4 NAD<sup>+</sup>- und Nicotinamid-Verfügbarkeit

Die Regulation der SIRT1-Aktivität erfolgt auch über die Verfügbarkeit des Cofaktors NAD<sup>+</sup> (33) und ist damit abhängig vom metabolischen Zustand einer Zelle. (81) Die zelluläre Verfügbarkeit von NAD<sup>+</sup> wird durch verschiedene Faktoren reguliert (Abbildung 1-6): Einerseits kann NAD<sup>+</sup> aus diversen Nahrungsbestandteilen synthetisiert werden, etwa *de novo* aus der Aminosäure Tryptophan (Trp), aus Nicotinsäure (NA, Vitamin B3) über den Preiss-Handler-Weg oder aus dem in der Milch vorkommenden Nicotinamidribosid (NR). (33, 82, 83) Weiterhin kann das bei der SIRT1-Reaktion entstandene NAM wieder zu NAD<sup>+</sup> recycelt werden, wobei sich die Verwertungswege zwischen Hefe und Mensch unterscheiden. In Hefe bewirkt das Enzym Pnc1 (Pyrazinamidase / Nicotinamidase 1) eine Umformung von NAM zu NA, wodurch der Preiss-Handler-Weg beschriftet werden kann (83), während das NAM in Säugern durch das Enzym NAMPT (Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase; auch PBEF) einen kürzeren Verwertungsweg über

Nicotinamid-Mononucleotid (NMN) einschlägt (83, 84). Durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) wird infolge von Fasten oder Bewegung wiederum die *NAMPT*-Expression gesteigert, was in einem erhöhten  $\text{NAD}^+$ -Spiegel resultiert. (85) Andererseits gibt es neben SIRT1 weitere Enzyme, etwa Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs), die für ihre Reaktionen ebenfalls  $\text{NAD}^+$  benötigen. Dies führt zur Minderung des vorhandenen  $\text{NAD}^+$ -Pools einer Zelle. (84)



**Abbildung 1-6: Regulation der  $\text{NAD}^+$ -Verfügbarkeit einer Zelle**

$\text{NAD}^+$  kann aus verschiedenen Nahrungskomponenten über den Preiss-Handler-Weg (NA, Trp) oder einen alternativen Verwertungsweg (NAM, NR) synthetisiert werden. AMPK: AMP-aktivierte Proteinkinase; NA: Nicotinsäure; NAAD: Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid; NAD: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; NAM: Nicotinamid; NAMN: Nicotinsäure-Mononucleotid; NAMPT: Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase; NMN: Nicotinamid-Mononucleotid; NR: Nicotinamidribosid; PARP: Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase; Pnc1: Pyrazinamidase / Nicotinamidase 1; Trp: Tryptophan.

Das SIRT1-Reaktionsprodukt NAM kann in höheren Konzentrationen eine Rückkopplungshemmung auf die SIRT1-Aktivität hervorrufen. (33) Es hemmt SIRT1 bezüglich  $\text{NAD}^+$  nicht-kompetitiv. (86) NAM bindet in der C-Tasche der  $\text{NAD}^+$ -Bindungstasche (66) und bewirkt am ternären ADP-Ribose-Enzym-Acetylpeptid-Komplex eine Umkehr der Deacetylierungsreaktion unter Regeneration von  $\text{NAD}^+$  (Transglykosidierung) (87). In *S. cerevisiae* wurde eine NAM-Depletion durch Überexpression von *PNC1* mit einer erhöhten Sir2-Aktivität in Verbindung gebracht. (88)

#### 1.2.4.1.5 Proteininteraktionen

Auch durch die Interaktion diverser Proteine mit SIRT1 kann die enzymatische Aktivität reguliert werden. Das bisher einzige bekannte Protein mit positiver Wirkung auf die SIRT1-Aktivität ist AROS (*active regulator of SIRT1*). (33) Dieses nucleäre Protein bindet im Bereich der Aminosäuren 114-217 direkt (89) an die allosterische Bindungsstelle von SIRT1 (62). Infolge dieser Bindung wurde eine gesteigerte Deacetylierung von p53 festgestellt. (89) Beispiel für ein SIRT1-inhibierendes Protein ist DBC1 (*deleted in breast cancer 1*), welches direkt mit dem katalytischen Kern von SIRT1 interagiert und die Deacetylierung von p53 hemmt. (90, 91) Diese hemmende Wirkung kann dadurch erklärt werden, dass DBC1 an dieselbe oder eine überlappende Stelle von SIRT1 bindet wie die ESA-Sequenz (siehe 1.2.3). Da DBC1 eine größere Affinität als ESA aufweist, kann es dieses verdrängen und die Funktion von SIRT1 unterdrücken. (71)

#### 1.2.4.2 Exogene Regulation

Neben diesen vielfältigen, intrazellulären Regulationsmechanismen gibt es auch zahlreiche Moleküle, durch welche die enzymatische Funktion von Sirtuinen auch exogen modifiziert werden kann.

##### 1.2.4.2.1 Inhibierende kleine Moleküle

###### Strukturanaloga mit inhibierender Funktion

In etlichen Studien wurde die Möglichkeit untersucht, die Deacetylaseaktivität von Sirtuinen durch Strukturanaloga von am Reaktionsprozess beteiligten Komponenten zu hemmen.

So kann das NAD<sup>+</sup>-Analogon carba-NAD<sup>+</sup> nicht hydrolysiert und demzufolge kein NAM abgespalten werden. (92, 93) Da dieser Vorgang grundlegend für die Deacetylasefunktion ist (70), ist diese somit gehemmt (92, 93). Auch Mimetika von Adenosin, einem Bestandteil von NAD<sup>+</sup>, können durch Blockierung der enzymatischen Adenosin-Bindungsstelle (A-Tasche) inhibierend auf Sirtuine wirken. (94)

Weiterhin wurden Analoga zu acetylierten Peptidsubstraten entwickelt. (95-98) Die Substitution des in der N<sup>ε</sup>-Acetylgruppe von Lysin befindlichen Sauerstoffs durch ein Schwefelatom (N<sup>ε</sup>-Thioacetylgruppe) bewirkt eine deutlich langsamere SIRT1-vermittelte Deacetylierung. (95) Aber auch andere Modifikationen, wie

N<sup>ε</sup>-Selenoacetyl oder N<sup>ε</sup>-Isothiovaleryl weisen stark inhibitorische Eigenschaften gegenüber SIRT1 auf. (97)

### Strukturell unverwandte Moleküle mit inhibierender Funktion

Neben den Strukturanaloga wurden auch zahlreiche, strukturell andersartige Moleküle als Sirtuininhibitoren identifiziert.

**Sirtinol** (IC<sub>50</sub>(SIRT1) = 37,6 μM (99) bzw. 131 μM (100)), **Salermid** (IC<sub>50</sub>(SIRT1) = 76,2 μM) (99), und **Cambinol** (IC<sub>50</sub>(SIRT1) = 56 μM) (101) haben eine β-Naphthol-Gruppe gemeinsam (Abbildung 1-7) (101-103), die offensichtlich für die inhibierende Wirkung dieser Substanzen verantwortlich ist (100, 101, 104), und in der C-Tasche von Sirtuinen bindet (102, 105, 106). Für Cambinol wurde außerdem ein kompetitiv inhibierender Mechanismus von SIRT2 bezüglich des Peptidsubstrates beschrieben. (101)

In der C-Tasche bindet auch **EX-527** (Abbildung 1-7) (99, 105, 107), mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 98 nM bzw. 1,29 μM der stärkste aus einer ganzen Reihe von Indol-basierten SIRT1-Inhibitoren. (107)

Ebenfalls sehr potent ist der polyanionische Naphthylharnstoff **Suramin** (Abbildung 1-7). Dieses sehr große Molekül hemmt SIRT1 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 297 nM. (108) Aufgrund einer fehlenden Kristallstruktur aus SIRT1 und Suramin gibt eine Studie an SIRT5 Aufschluss über die Bindungseigenschaften von Suramin. Diese zeigt, dass das symmetrisch angeordnete Suramin zeitgleich mit zwei SIRT5-Monomeren eine Bindung eingehen kann. Durch Interaktion mit der B-Tasche, der C-Tasche sowie der Substratbindungsstelle wird das Enzym gehemmt. (109)

Weitere SIRT1-Inhibitoren sind **Tenovin-1** und **Tenovin-6** (IC<sub>50</sub> = 21 μM) (110), sowie die **Phloroglucinol-Derivate** Guttiferon G (IC<sub>50</sub> = 9 μM), Aristoforin (IC<sub>50</sub> = 7 μM) und Hyperforin (IC<sub>50</sub> = 15 μM) (111). Auch **Zn<sup>2+</sup>**, das intramolekular für die Struktur und Funktion von SIRT1 wichtig ist, hemmt dessen enzymatische Aktivität wenn es exogen zugesetzt wird. Die Ursache dafür liegt vermutlich darin, dass es in diesem Fall an eine andere Stelle als die Zn<sup>2+</sup>-bindende Struktur der kleinen Subdomäne bindet. (112)

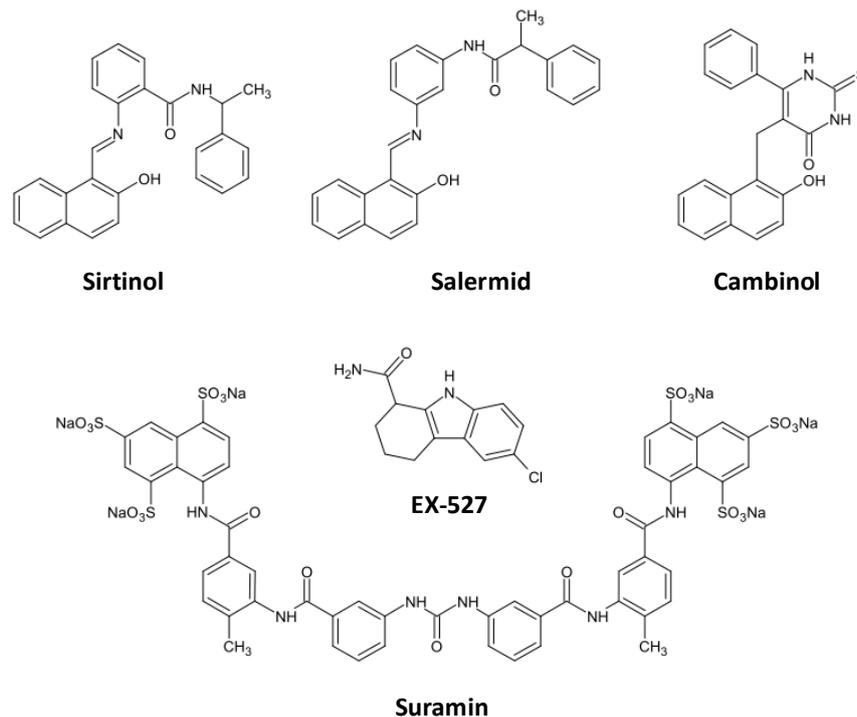


Abbildung 1-7: Strukturformeln ausgewählter SIRT1-Inhibitoren

### Physiologische Bedeutung

Die oben genannten Strukturanaloga sind als Sirtuininhibitoren unter physiologischen Bedingungen ungeeignet.  $\text{NAD}^+$ -basierte Inhibitoren sind häufig nicht sehr enzyspezifisch. Während sich Adenosinmimetika insbesondere auf Kinasen hemmend auswirken können (94), könnte auch carba- $\text{NAD}^+$  neben den Sirtuinen noch andere  $\text{NAD}^+$ -abhängige Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen. (93, 113) Die Entwicklung von carba- $\text{NAD}^+$ -basierten, selektiven Sirtuininhibitoren scheidet allerdings auch daran, dass es keine Zellpermeabilität aufweist. (93) Auch peptidbasierte Inhibitoren mit niedrigen  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $0,24 \mu\text{M}$  (97) oder  $2 \mu\text{M}$  (95) für SIRT1 können strukturbedingt die Zellmembran nur eingeschränkt passieren. Die Entwicklung eines Peptid-unabhängigen,  $\text{N}^{\epsilon}$ -Thioacetyllysin-enthaltenden Inhibitors, mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,7 \mu\text{M}$  für SIRT1 ermöglicht jedoch eine zelluläre Nutzung solcher Substratmimetika. (98)

Die strukturell unverwandten Moleküle hingegen spielen physiologisch gesehen eine weit größere Rolle, da sie meist leicht in die Zelle aufgenommen werden können. (101, 104, 107, 110) Für einige von ihnen konnte bereits eine Antitumorwirkung in Krebszellen nachgewiesen werden. (101, 102) Beispielsweise löste eine Behandlung von Burkitt Lymphomzellen mit Cambinol eine gesteigerte

Apoptoserate aus. Dies könnte mit dem unter dieser Behandlung beobachteten erhöhten Acetylierungsstatus von p53 und BCL6 (*B-cell CLL/lymphoma 6*) in Zusammenhang stehen. P53 besitzt im acetylierten Zustand eine erhöhte, das Onkoprotein BCL6 eine verminderte Aktivität. (101) Daneben konnten Salermid und Sirtinol in der Brustkarzinomzelllinie MCF-7 unter erhöhter p53-Acetylierung den Zelltod hervorrufen. (99) Aber auch die oben erwähnten Tenovine und Phloroglucinol-Derivate zeigen eine inhibierende Wirkung auf proliferierende Zellen. (110, 111) Diese Ergebnisse sprechen für die positive Wirkungsweise von SIRT1-Inhibitoren in tumorösem Gewebe.

#### 1.2.4.2.2 Aktivierende kleine Moleküle

##### Strukturanaloga mit aktivierender Funktion

Die Arbeitsgruppe um Sauve *et al.* entdeckte 2005, dass Isonicotinamid (INAM) eine aktivierende Wirkung auf Sir2 ausübt. INAM ist ein nicht-reaktives Strukturanalogon des bei der Deacetylierungsreaktion entstehenden natürlichen Sirtuininhibitors NAM. (114) NAM bindet in der NAM-Bindungstasche von Sirtuinen (66) und bewirkt durch Transglykosidierung (siehe 1.2.4.1.4) eine Umkehr und damit Hemmung der Deacetylierungsreaktion (87). INAM wirkt kompetitiv bezüglich NAM und vermindert dadurch die Bindung von freiem NAM in der NAM-Bindungstasche von Sir2. Dadurch kann die Deacetylierungsreaktion ungehindert durch das physiologisch ständig vorhandene NAM ablaufen mit der Folge einer erhöhten Umsatzrate. (114)

##### Strukturell unverwandte Moleküle mit aktivierender Funktion

Die ersten strukturell nicht mit Reaktionskomponenten verwandten kleinen Moleküle mit einem aktivierenden Einfluss auf SIRT1 wurden 2003 von der Arbeitsgruppe um Howitz *et al.* entdeckt. Diese Substanzen umfassen die drei Klassen der Stilbene, Chalcone und Flavone. Als stärkster SIRT1-Aktivator ging neben dem Stilben Piceatannol (7,9-fache Aktivierung) und dem Chalcon Butein (8,5-fache Aktivierung) das Stilben **Resveratrol** (RSV) (13,4-fache Aktivierung) (Abbildung 1-8) aus dieser Studie hervor. Der Mechanismus, über welchen das natürlich vorkommende RSV die Aktivierung von SIRT1 auslöst, liegt in der Reduzierung der Michaelis-Konstanten ( $K_m$ ) für die Substrate. So wurde für das verwendete Peptidsubstrat ein 35-fach reduzierter und für  $NAD^+$  ein fünffach

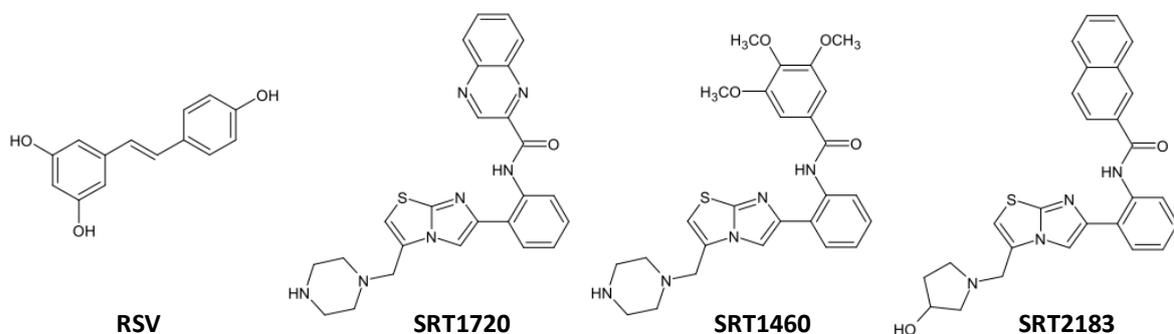
reduzierter  $K_m$ -Wert ermittelt. Aufgrund dessen wurde RSV als allosterischer Aktivator definiert. (115)

Vier Jahre später wurde mit den **SRT-Substanzen** (Abbildung 1-8) eine Gruppe neuer, synthetischer SIRT1-Aktivatoren identifiziert. Diese Substanzen unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich von RSV und den anderen vormals bestimmten SIRT1-Aktivatoren. Im Vergleich zu RSV weisen die SRT-Substanzen eine höhere maximale Aktivierung von SIRT1 auf sowie deutlich geringere  $EC_{50}$ -Werte (Tabelle 1-2). (116)

**Tabelle 1-2:  $EC_{50}$ -Werte und maximale Aktivierung bekannter SIRT1-Aktivatoren** (nach (116))

Substanz	$EC_{50}$ -Wert	maximale Aktivierung
RSV	46,2 $\mu$ M	201%
SRT1460	2,9 $\mu$ M	447%
SRT2183	0,36 $\mu$ M	296%
SRT1720	0,16 $\mu$ M	781%

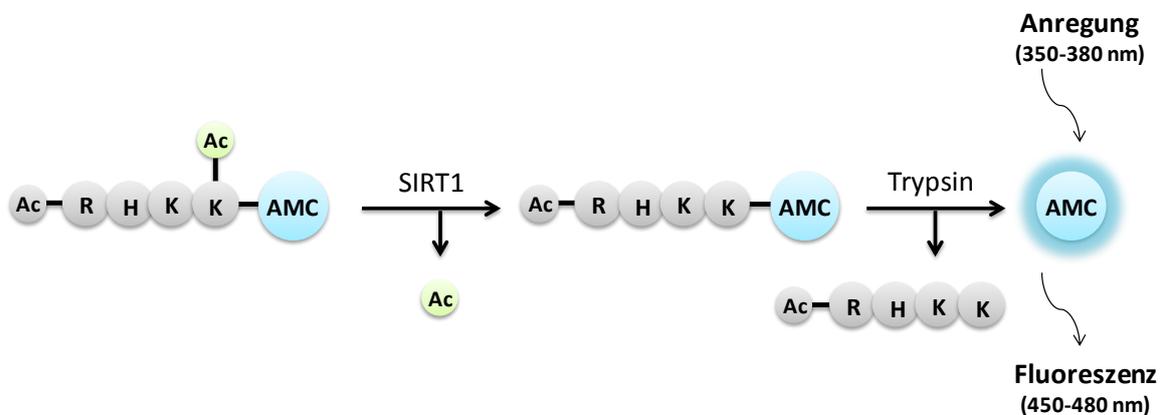
In dieser Studie wurde bezüglich SIRT1 eine Reduzierung der  $K_m$ -Werte des Peptidsubstrates, nicht jedoch von  $NAD^+$ , durch die getesteten Substanzen festgestellt, was wiederum mit einem allosterischen Aktivierungsmechanismus in Verbindung gebracht wurde. (116) Allerdings bestehen Zweifel hinsichtlich der SIRT1-aktivierenden Funktion dieser Substanzen.



**Abbildung 1-8: Strukturformeln ausgewählter artifizierlicher SIRT1-Aktivatoren**

### Generierung von Artefakten

Das Screeningverfahren, bei welchem RSV als SIRT1-Aktivator identifiziert worden war, beruhte auf der fluoreszenzbasierten *Fluor-de-Lys-* (*FdL-*) Methode. (115) Bei dieser Methode wird im primären Schritt ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4-Amino-7-methylcoumarin (AMC) markiertes Peptidsubstrat durch SIRT1 deacetyliert. Aufgrund dieser Deacetylierung kann der Fluoreszenzfarbstoff im zweiten Schritt durch Trypsin von dem Peptidsubstrat abgespalten werden und dadurch fluoreszieren (Abbildung 1-9). (117-119)



### **Abbildung 1-9: Reaktionsprinzip der *Fluor-de-Lys-*Methode**

Das mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMC markierte Peptid wird im ersten Reaktionsschritt von SIRT1 deacetyliert. Dadurch kann Trypsin in einem zweiten Reaktionsschritt das AMC vom Peptid abspalten. Das freigesetzte AMC kann nach Anregung bei einer Wellenlänge im Bereich von 350 – 380 nm Fluoreszenz im Wellenlängenbereich 450 – 480 nm emittieren. AMC: 4-Amino-7-methylcoumarin.

Im Jahr 2005 wurde die SIRT1-aktivierende Funktion von RSV von zwei Arbeitsgruppen in Frage gestellt. Dabei wurde aufgedeckt, dass der Aktivierungseffekt, den RSV *in vitro* auf SIRT1 ausübt, nur unter Anwesenheit einer Fluoreszenzmarkierung am Peptidsubstrat nachweisbar ist. (118, 119) Bei Verwendung eines Peptides mit identischer Sequenz, allerdings ohne die Markierung, konnte durch den Naturstoff keinerlei Aktivierung von SIRT1 hervorgerufen werden. (118) Außerdem wurde festgestellt, dass die Affinität eines fluoreszenzmarkierten Peptides zu SIRT1 im Vergleich zu einem unmarkierten Peptid deutlich reduziert ist. Während RSV die Affinität des markierten Peptides deutlich erhöhte, hatte es hingegen keinen Einfluss auf die Affinität des

unmarkierten Peptides. (118, 119) Es wurde propagiert, dass sich durch die Bindung von RSV die Struktur von SIRT1 so verändert, dass das AMC und damit auch das markierte Peptid besser an das Enzym binden können. Dies führt schließlich zu einer effektiveren Deacetylierungsreaktion. (118)

In ihrer Veröffentlichung im Jahr 2010 zweifelten schließlich Pacholec *et al.* neben RSV auch die SRT-Substanzen SRT1720, SRT2183 und SRT1460 in ihrer Fähigkeit, SIRT1 direkt bzw. enzymatisch zu aktivieren, an. (120) Auch diese vermeintlichen SIRT1-Aktivatoren waren unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Peptides (MR121 oder TAMRA) ermittelt worden. (116) Und auch in diesem Fall konnte der propagierte Aktivierungseffekt nicht bestätigt werden, wenn unmarkierte Peptide eingesetzt wurden. (120)

Die Hypothese, die Fluoreszenzfarbstoffe an den Peptidsubstraten könnten einen Teil einer natürlichen Proteinstruktur und auf diese Weise physiologische Bedingungen nachahmen (120), wurde in verschiedenen Studien überprüft. (120, 121) Bezüglich RSV konnte unter Verwendung des acetylierten Proteins PGC-1 $\alpha$  als Substrat keine verstärkte Deacetylaseaktivität von SIRT1 nachgewiesen werden (121), wie auch für RSV, SRT1720, SRT1460 und SRT2183 unter Einsatz des acetylierten Proteins p53. Wurde das acetylierte Protein Acetyl-CoA-Synthetase 1 als Substrat verwendet, so zeigten die SRT-Substanzen sowie RSV eine schwache oder keine Steigerung der Deacetylaseaktivität von SIRT1. (120)

### Physiologische Bedeutung

RSV wird als Mimetikum der Kalorienrestriktion bezeichnet. (115, 122) Dies rührt daher, dass in den Organismen *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* eine verlängerte Lebensspanne nach RSV-Gabe festgestellt werden konnte. Dieser Effekt wurde auf eine Aktivierung der jeweiligen SIRT1-Homologe durch RSV zurückgeführt. (115, 123) In Mäusen konnte ein lebensverlängernder Effekt durch RSV nur in hochkalorisch ernährten Tieren (124), nicht jedoch in Tieren auf einer Standarddiät, erzeugt werden (125). Allerdings wiesen die Tiere beider Diätformen durch den Zusatz von RSV eine Verbesserung altersbedingter Erkrankungen auf, etwa eine gesteigerte Insulinsensitivität (124) oder eine reduzierte Kataraktbildung (125). Zudem konnte das metabolische Profil adipöser Männer durch RSV-Gaben über 30 Tage hinweg verbessert werden. (126)

Hinsichtlich dieser Wirkungen von RSV herrscht jedoch Unklarheit. Wie bereits die Verbindung zwischen SIRT1 und Kalorienrestriktion bzw. Lebensverlängerung angezweifelt wurde (s. 1.2.2), so konnte auch bezüglich RSV der lebensverlängernde Effekt in den Organismen *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* entweder nicht reproduziert (119, 127), oder aber nicht mit dem jeweiligen Sirtuin in Verbindung gebracht werden (127). Es wird vermutet, dass sich die positiven Gesundheitseffekte des Naturstoffes in Säugern indirekt lebensverlängernd auswirken könnten. (33) Neuere Studien lassen zudem auf einen indirekten RSV-abhängigen Aktivierungsmechanismus von SIRT1 schließen. Demnach wird das Enzym AMPK durch RSV aktiviert. (128) Die dadurch erhöhte NAD<sup>+</sup>-Produktion führt zu einer gesteigerten enzymatischen Aktivität von SIRT1. (85, 128, 129)

Auch durch SRT1720, die potenteste der SRT-Substanzen, konnte in adipösen Mäusen ein lebensverlängernder Effekt erzielt werden. (130) Weiterhin zeigte eine Studie in verschiedenen Nagetiermodellen die Verbesserung diverser gesundheitlicher Parameter, wie eine erhöhte mitochondriale Kapazität, eine verbesserte Insulinsensitivität und eine Reduktion des Plasmaglucosespiegels bzw. eine verbesserte Glucosetoleranz. (116)

Diesen Ergebnissen steht eine andere Studie gegenüber, die nach Verabreichung derselben, sehr hohen SRT1720-Dosierung wie in (116) vom frühzeitigen Tod einiger Versuchsmäuse berichtet. Außerdem konnte in dieser Studie bei Mäusen mit einer geringeren SRT1720-Dosierung, die jedoch toleriert wurde und eine vergleichbare Plasmaexposition wie in (116) aufwies, kein Effekt auf die mitochondriale Kapazität oder auf diverse Glucoseparameter nachgewiesen werden. Des Weiteren stellt sich für SRT1720 genauso wie für RSV die Frage der direkten Aktivierung von SIRT1. (120)

### 1.3 Screening auf Sirtuin 1-Modulatoren

Die große Fülle vorhandener Studien, die sich mit einer Aktivierung oder Inhibierung von SIRT1 auseinandersetzen (s. 1.2.4), spiegelt das starke Interesse an der Modulation der Aktivität dieses Enzyms wider. Im Hinblick auf die Entwicklung von Nahrungsergänzungsmitteln oder Medikamenten zur Prävention oder Therapie altersbedingter Erkrankungen spielen kleine, die Aktivität von

SIRT1 modulierende Moleküle möglicherweise eine wichtige Rolle. Solche kleinen Moleküle werden meist im Rahmen von Hochdurchsatz-Screening- (HTS-) Verfahren ermittelt. Dabei werden mehr oder weniger umfangreiche Substanzbibliotheken auf Moleküle hin durchsucht, die ein ausgewähltes Zielprotein, wie z. B. SIRT1, in seinen Eigenschaften modulieren können. (131)

### **1.3.1 *Naturstoffe vs. synthetische Stoffe***

Substanzbibliotheken lassen sich aufgrund der Herkunft ihrer Moleküle in zwei Hauptkategorien einteilen: in Naturstoffe inklusive ihrer Derivate und in synthetische Moleküle. (132) Obwohl viele Medikamente auf Naturstoffen basieren, etwa Morphin oder Penicillin (133), stützen sich Pharmafirmen bei ihrer Suche nach neuen Wirkstoffen bereits seit vielen Jahren überwiegend auf kombinatorische Substanzbibliotheken synthetischen Ursprungs. Dieser Trend liegt in dem hohen wirtschaftlichen Konkurrenzdruck begründet. (133, 134) Um schneller neue Wirkstoffe für Medikamente zu finden wurden HTS-Methoden entwickelt. Naturstoffe haben im Gegensatz zu synthetischen Molekülen viele Nachteile was ihre Anwendbarkeit in HTS-Verfahren betrifft. Sie sind oft nur in kleinen Mengen und mit geringer Reinheit verfügbar. Auch die wiederholte Isolierung bereits bekannter Substanzen stellt ein Problem dar (134), insbesondere was deren Patentierbarkeit betrifft (133). Außerdem sind Naturstoffe häufig strukturell sehr komplex, was nachträgliche chemische Modifikationen besonders aufwändig macht. All diese Faktoren sind mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verbunden und haben dazu geführt, dass Naturstoffe von synthetisch hergestellten Substanzen bei der Wirkstoffsuche verdrängt wurden. (134)

Allerdings besitzen Naturstoffe verglichen mit synthetisch hergestellten Stoffen auch Vorteile. Sie durchlaufen einen natürlichen Selektionsprozess, der sie für Interaktionen mit verschiedensten biologischen Makromolekülen optimiert. (132) Auf diese Weise erreichen sie eine außergewöhnliche strukturelle Diversität. (132, 134) Dies ist auch der Grund dafür, dass die Trefferrate in HTS-Verfahren für Naturstoffe sehr viel höher ist als für die strukturell einfacheren synthetischen Substanzen. (133) Naturstoffe sind zudem häufig aufgrund ausgezeichneter pharmakokinetischer Eigenschaften ohne weitergehende chemische Modifikationen als Medikamente einsetzbar. (134)

Die Entwicklung neuer Technologien verbessert zunehmend die Zugänglichkeit zu größeren Mengen reiner Naturstoffe und begünstigt somit den Einsatz dieser Substanzen in HTS-Verfahren. (134) Die beträchtliche Anzahl bislang unentdeckter Spezies deutet auf eine Fülle vielversprechender, noch unbekannter Naturstoffe hin. (133)

### **1.3.2 Detektionsmethoden**

Bei der Auswahl einer geeigneten Screeningmethode für SIRT1-Modulatoren können verschiedene Detektionsmethoden in Betracht gezogen werden.

Eine gängige Methode beruht auf der radioaktiven Markierung eines Substrates der SIRT1-Deacetylierungsreaktion. Nach erfolgter Reaktion wird das entstandene radioaktiv markierte Produkt von dem übrigen markierten Edukt abgetrennt und quantifiziert. (119) Der große Nachteil dieser Methode liegt vor allem in der Lagerung, Verwendung und Entsorgung des radioaktiven Materials. (135)

In SIRT1-Screeningverfahren werden sehr häufig auf Lumineszenz basierende Methoden genutzt, wobei der Fokus auf der Detektion von Fluoreszenz (Photolumineszenz) liegt. Am bekanntesten und am weitesten verbreitet ist die *FdL*-Methode (Abbildung 1-9), (115) die jedoch anhand eines fluoreszenzmarkierten Peptides eine Reihe von Artefakten erzeugte, etwa die angebliche enzymatische Aktivierung von SIRT1 durch RSV (s. 1.2.4.2.2). (118, 119) Eine weitere Schwierigkeit der Fluoreszenzdetektion ist, dass viele Naturstoffe und andere Moleküle autofluoreszierende oder Fluoreszenz-löschende Eigenschaften aufweisen. Dies kann bei konventionell angewendeten, optischen Methoden zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. (136)

In Biolumineszenz-basierten Methoden ist die zu untersuchende, primäre Enzymreaktion, etwa die der Deacetylierung durch SIRT1, meist an eine sekundäre Reaktion mit dem Enzym Luciferase gekoppelt. (137, 138) Bei Versuchsanordnungen mit gekoppelten enzymatischen Reaktionen besteht die Möglichkeit, dass die untersuchten Moleküle einer Screeningbibliothek neben dem primären Enzym auch nachgeschaltete Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen und auf diese Weise das Ergebnis verfälscht wird. (136)

Anhand der aufgeführten Methoden wird deutlich, dass die (direkte) Detektion unmarkierter Substrate und/oder Produkte ohne die Notwendigkeit nachfolgender Reaktionen von Vorteil sein sollte. Dabei könnten zum Beispiel

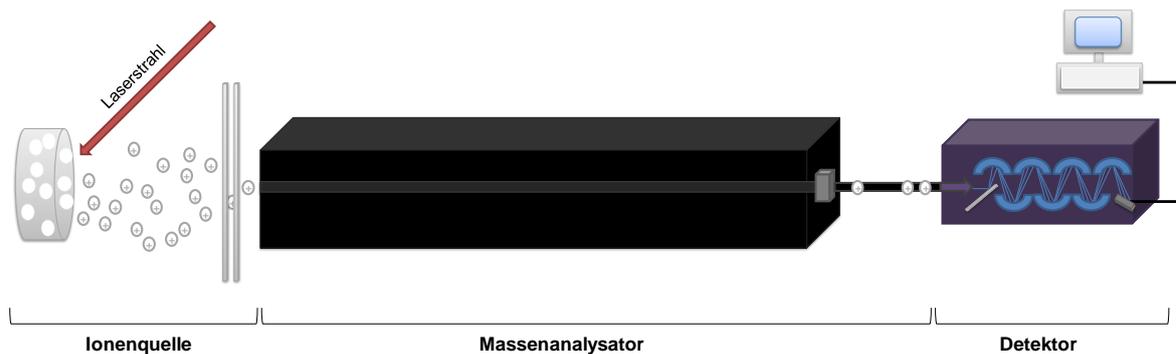
chromatographische oder massenspektrometrische Methoden Alternativen sein, um artefaktfrei im hohen Durchsatz neue kleine Moleküle mit genregulatorischem Potential zu identifizieren.

Ein Beispiel für eine chromatographische Methode ist die HPLC (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie). Anhand einer chromatographischen Säule erfolgt die Auftrennung der acetylierten (Substrat) und deacetylierten (Produkt) Peptide aus der SIRT1-katalysierten Reaktion, deren mengenmäßige Verhältnisse anschließend quantifiziert werden können. Der chromatographische Prozess ist jedoch mit einem relativ hohen Zeitaufwand verbunden, sowohl für den Lauf selbst als auch für nachfolgende Wasch- und Reäquilibrierungsschritte. (120) Dies macht ihn für den Einsatz in HTS-Verfahren eher ungeeignet.

Unter den massenspektrometrischen Methoden stellt insbesondere MALDI-TOF (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit) MS (Massenspektrometrie) (139) eine vielversprechende Anwendung für HTS-Verfahren dar. Das Prinzip dieser Methode sowie deren Einsatz im Screeningverfahren werden im nachfolgenden Kapitel genauer erläutert.

#### 1.4 Massenspektrometrie

Mithilfe eines Massenspektrometers können Moleküle ionisiert und anschließend anhand ihres Masse-zu-Ladung- ( $m/z$ -) Verhältnisses aufgetrennt werden. Diese Prozesse finden in einem Hochvakuum statt. Ein Massenspektrometer kann generell in drei Bestandteile unterteilt werden: Die Ionenquelle dient der Ionenerzeugung, der Massenanalysator ist für die Auftrennung der Ionen zuständig und der Detektor wird für den Ionennachweis eingesetzt (Abbildung 1-10). (140)



**Abbildung 1-10: Bestandteile eines Massenspektrometers**

In der Ionenquelle werden aus der Probe Ionen generiert, die mithilfe eines elektrostatischen Feldes in Richtung des Massenanalysators beschleunigt werden. Dort werden sie nach ihrem Masse-zu-Ladung- ( $m/z$ -) Verhältnis aufgetrennt. Im Detektor erfolgt der Nachweis der separierten Ionen. Das Signal wird digitalisiert und visualisiert.

#### 1.4.1 MALDI-TOF MS Prinzip

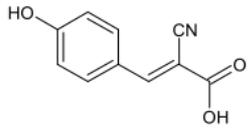
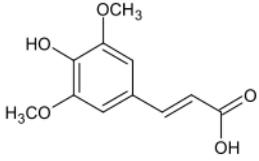
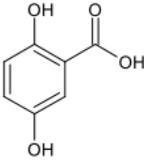
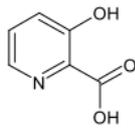
Die Bezeichnung MALDI-TOF MS (139) beruht auf der Art der in diesem Verfahren eingesetzten Ionenquelle (MALDI) sowie des verwendeten Massenanalysators (TOF).

##### 1.4.1.1 Ionenquelle

Die Ionenerzeugung durch MALDI basiert auf einer Cokristallisation von Proben- und Matrixmolekülen. (140, 141) Üblicherweise wird die aufgereinigte Probenlösung mit einer geeigneten Matrixlösung (Tabelle 1-3) vermischt und auf eine Metallplatte, das sogenannte Target, aufgetragen. Durch Verdunsten des Lösungsmittels bildet die Matrix ein Kristallgitter aus, in welches die Probenmoleküle eingebaut sind. (140) In der Ionenquelle des Massenspektrometers wird der Kristall mit einem Laser beschossen. Dies führt zur elektronischen Anregung der Matrixmoleküle, welche im Wellenlängenbereich des eingesetzten Lasers absorbieren (Tabelle 1-3), und hat zur Folge, dass sowohl Matrix- als auch Probenmoleküle in die Gasphase übergehen. (140, 141) Die Absorption der Laserstrahlung durch die Matrix wirkt sich schützend auf die Probenmoleküle aus, sodass diese den Desorptionsprozess in intaktem Zustand überdauern. (139-142) Außerdem maximiert die Matrix durch eine Übertragung von Protonen den Ionisierungsprozess der Probenmoleküle. Durch eine Elektrode, die sich in unmittelbarer Nähe des Kristalls befindet, werden die generierten Ionen

schließlich in Richtung des Massenanalysators beschleunigt (Abbildung 1-10). (140)

**Tabelle 1-3: Strukturen, Anwendungsgebiete und geeignete Laserwellenlängen verbreiteter MALDI-Matrices (nach (141))**

<b><math>\alpha</math>-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA)</b>	<b>3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure)</b>	<b>2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)</b>	<b>3-Hydroxypicolinsäure (HPA)</b>
			
Peptide, Lipide, Nukleotide	Peptide, Proteine, Lipide	Peptide, Oligo-, Nukleotide	Oligonukleotide
337 nm, 355 nm	266 nm 337 nm, 355 nm	266 nm 337 nm, 355 nm	337 nm, 355 nm

#### 1.4.1.2 Massenanalysator

Im MALDI-TOF-Verfahren wird die Masse der in der Ionenquelle generierten Ionen nach ihrer Flugzeit (TOF, *time-of-flight*) im Massenanalysator bestimmt. Die Ionen werden durch ein elektrostatisches Feld in der Ionenquelle beschleunigt und erreichen so aufgrund ihres jeweiligen Masse-zu-Ladung- ( $m/z$ -) Verhältnisses unterschiedliche Geschwindigkeiten. Dies führt in der anschließenden feldfreien, konstanten Driftstrecke des Massenanalysators zu einer Auftrennung der Ionen, die schließlich nach unterschiedlichen Flugzeiten am Detektor auftreffen (Abbildung 1-10). Da das  $m/z$ -Verhältnis eines Ions dem Quadrat der Flugzeit proportional ist, ist bei bekannter Ladung die Ermittlung der Masse eines Ions auf diese Weise möglich. (140)

#### 1.4.1.3 Detektor

Die im Massenanalysator aufgetrennten Ionen treffen am Ende ihrer Flugzeit auf einer Konversionsdynode mit einem den Ionen entgegengesetzten Potential auf. Die Ionen bewirken, dass aus dieser Konversionsdynode Sekundärelektronen herausgelöst werden, die wiederum Sekundärelektronen aus den aufeinander

folgenden Dynoden eines nachgeschalteten Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) herauslösen. Auf diese Weise entsteht eine Elektronenkaskade, die das Signal der auftreffenden Ionen verstärkt (Abbildung 1-10). Das detektierte Signal wird digitalisiert und erscheint schließlich am Computer in visualisierter Form als Peakspektrum. (140)

#### **1.4.2 MALDI-TOF MS im Screeningverfahren**

Massenspektrometrische Verfahren sind prinzipiell sehr gut dafür geeignet, den Fortschritt einer SIRT1-Deacetylierungsreaktion nachzuvollziehen und auf diese Weise SIRT1-modulierende Moleküle ausfindig zu machen. Der Massenunterschied von 42 Da, der zwischen dem acetylierten Peptidsubstrat und dem deacetylierten Reaktionsprodukt besteht (143), kann anhand des  $m/z$ -Verhältnisses der Peptide (s. 1.4.1.2) direkt detektiert werden (140).

Im Hinblick auf die Entwicklung eines HTS-Verfahrens zur Ermittlung von SIRT1-Modulatoren weist die MALDI-TOF MS einige Vorteile gegenüber ESI (Elektrospray-Ionisation) (144) MS auf, einer weiteren gängigen MS-Methode. Allerdings ist der Einsatz der MALDI-TOF MS in diesem Kontext auch mit Herausforderungen verbunden.

##### 1.4.2.1 Vorteile

Im Vergleich zu der MALDI-TOF MS, bei der die Probe in kristallinem Zustand in die Ionenquelle eingebracht wird (s. 1.4.1.1), wird diese bei der ESI MS in flüssigem Zustand über eine feine Kapillare eingesprüht. (140) Während bei der MALDI-TOF Messung ein Target mit z. B. 384 separaten Probenpunkten von einem Laser innerhalb von wenigen Sekunden pro Position abgerastert werden kann, wird für die ESI Messung vergleichsweise mehr Zeit benötigt. Dies hängt u. a. mit der Notwendigkeit zusammen, die Kapillare zwischen den einzelnen Proben zu waschen, um beispielsweise eine Probenkontamination zwischen den Messungen zu vermeiden. Insbesondere im Rahmen eines Screenings, in welchem jede Probe dieselben Peptide enthält, könnte dies große Nachteile mit sich bringen, da die Entscheidung für oder gegen eine Probe als Screeninghit aufgrund des jeweiligen Peptidverhältnisses getroffen wird.

Des Weiteren kann die Spitze der ESI-Kapillare sehr leicht verstopfen, sei es durch auskristallisierte Analyten oder durch Verunreinigungen wie Mikropartikel.

(140) Solche Partikel können vor allem in Screeningproben vorhanden sein, wenn die in der Reaktion getesteten kleinen Moleküle durch den Aufreinigungsprozess nicht ausreichend entfernt werden konnten. Auch diesbezüglich ist das MALDI-TOF-Verfahren vorteilhaft, da es Verunreinigungen gegenüber eine gewisse Toleranz aufweist. (143)

#### 1.4.2.2 Probleme

Ein generelles Problem bei der Anwendung von MALDI-TOF MS als Detektionsmethode besteht in der Quantifizierung von Proben. Diese setzt voraus, dass die Ionenhäufigkeit einer Probe, die auf der y-Achse des Massenspektrums als relative Peakintensität dargestellt wird, nur von der vorhandenen Konzentration bzw. Menge der Probe abhängig ist. (145)

Die relative Peakintensität wird von mehreren Faktoren beeinflusst, insbesondere aber von inhomogener Probenpräparation, welche die Bildung sogenannter „Hot Spots“ begünstigt. Diese Stellen innerhalb eines Probenpunktes ergeben besonders hohe Signalintensitäten im Vergleich zu anderen Stellen. (145) Als Ursache für die Entstehung solcher „Hot Spots“ werden einerseits lokal divergierende Mischungsverhältnisse von Analyt und Matrix innerhalb des Kristalls diskutiert. (140, 145) Andererseits könnte auch die Ausrichtung des Kristalls in Bezug auf die Achse des Spektrometers Einfluss darauf haben. (146) In jedem Fall kann diesem Effekt durch eine möglichst homogene Probenpräparation entgegengesteuert werden. (140, 146) Die sogenannte „Dried Droplet“-Methode, bei welcher der Analyt vor dem Auftragen auf das Target oder auf dem Target selbst mit der Matrix vermischt wird, ist eher anfällig für die Bildung von „Hot Spots“. Demgegenüber steht die homogenere „Thin Layer“-Methode, bei der zuerst eine ebene Matrixschicht auf das Target aufgetragen wird. In einem zweiten Präparationsschritt können sich dann die Probenmoleküle, die sich in einem überwiegend wässrigen Lösungsmittel befinden, gleichmäßig in diese Matrixschicht einlagern. (140, 141)

Sind in einer Probe mehrere Analyten zugleich enthalten, treten zudem kompetitive Ionisierungsprozesse auf. Dies bedeutet, dass einige Analyten eine höhere Affinität für vorhandene Protonen aufweisen als andere, was wiederum zur Ionensuppression der jeweils anderen Analyten führt. In diesem Fall hilft nur eine Reduktion der Probenkomplexität. (145)

Die starke Variabilität von Peakintensitäten (s. o.) macht die Notwendigkeit deutlich, relevante Peaks in Relation zu einem anderen Peak desselben Spektrums zu setzen. Hierfür wird häufig ein interner Standard eingesetzt. Dieser sollte dem Analyten in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften so ähnlich wie möglich sein, damit er sich in Prozessen wie Extraktion und Kristallisation sowie in der Gasphase möglichst ähnlich wie der Analyt verhält. Aus diesem Grund ist eine mit stabilen Isotopen markierte Form des Analyten der beste interne Standard für kleinere Moleküle wie Peptide. Anhand interner Standards kann entweder die relative Quantifizierung eines Analyten erfolgen, oder aber, nach Anfertigung einer Kalibrationskurve aus Standard und Analyt, auch absolut quantifiziert werden. (145)

Es wird deutlich, dass die hier aufgeführten Probleme durch Optimierungsschritte durchaus relativiert werden können. Ein Massenspektrum mit lediglich zwei relevanten Peaks, nämlich dem eines acetylierten und dem des dazugehörigen deacetylierten Peptides, kann durch geeignete Methoden relativ einfach quantifiziert werden. Somit erfüllt die MALDI-TOF MS Detektionsmethode alle Voraussetzungen für die Entwicklung eines HTS-Verfahrens für SIRT1-Modulatoren. Anhand desselben Prinzips ist zudem die Detektion der Aktivitäten einer Reihe anderer posttranslational aktiver Enzyme denkbar, wie HDACs, HATs, Phosphatasen, Kinasen oder Methyltransferasen.

## 2 Zielsetzung

Eine Konsequenz der zunehmenden Alterung unserer Gesellschaft ist die hohe Prävalenz altersbedingter Erkrankungen, wie z. B. Typ-2 Diabetes. (4) Diverse Stoffwechselprozesse, die mit solchen Erkrankungen in Verbindung stehen, werden durch das Enzym SIRT1 reguliert (s. 1.2.2.2). Durch Modulation der enzymatischen Deacetylaseaktivität von SIRT1 kann folglich Einfluss auf die Gesundheit im Alter genommen werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Naturstoffe, die sich modulierend auf die Aktivität des Enzyms SIRT1 auswirken, in einem Screeningverfahren zu ermitteln, und diese anschließend weiter zu charakterisieren. Da viele der verfügbaren SIRT1-Screeningmethoden Nachteile aufweisen (s. 1.3.2), wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine MALDI-TOF MS-basierte Screeningmethode entwickelt, um eine schnelle und artefaktfreie Messung der SIRT1-vermittelten Deacetylierung von Peptidsubstraten zu ermöglichen. Anhand dieser Methode erfolgte schließlich das Screening einer Naturstoffbibliothek auf SIRT1-Modulatoren. Die auf diese Weise gefundenen Screeninghits wurden nachfolgend *in vitro* sowie in physiologisch relevanten Zellkulturmodellen auf diverse pharmakologische und chemische Eigenschaften hin untersucht. Darüber hinaus wurde die MALDI-TOF MS-basierte Methode mit der Histonacetyltransferase p300 für ein weiteres Enzym angewendet, um ihr generelles Potential für das Hochdurchsatz-Screening zu veranschaulichen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller / Lieferant
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Acetonitril (ACN)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Acetyl Coenzym A Natriumsalz	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamsäure (CHCA, <i><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> )	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Ameisensäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (PIC)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue R-250	BioRad (München, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium; High Glucose, GlutaMAX, Pyruvate</i> )	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Essigsäure	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)

Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Etoposid	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
EX-527	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA)
FBS (Fötales Bovines Serum) Superior	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
<i>Fluor-de-Lys-Peptid</i> <sup>[1]</sup>	Biomol International Inc. (Plymouth Meeting, MA, USA)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Lipopolysaccharide ( <i>E. coli</i> 0111:B4)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Naturstoffbibliothek (NPs, <i>natural products</i> )	AnalytiCon Discovery GmbH (Potsdam, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Nicotinamid (NAM)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 15 Well	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

<i>Peptide Calibration Standard II</i>	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
Ponceau S – Lösung	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
<i>Precision Plus Protein Dual Color Standards</i>	BioRad (München, Deutschland)
<i>Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
Resveratrol (RSV)	Biomol International Inc. (Plymouth Meeting, MA, USA) / Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
RPMI 1640	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
SRT1720	Cayman Europe (Tallinn, Estland)
Suramin-Natrium	Biomol International Inc. (Plymouth Meeting, MA, USA) / Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Titriplex III ( <i>ethylenedinitrilotetraacetic acid, disodium salt dihydrate</i> ) (EDTA)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Trifluoressigsäure (TFA, <i>trifluoroacetic acid</i> )	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
TrypLE Express	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
Wasser TraceSELECT	Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH (Steinheim, Deutschland)
<i>Western Lightning Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)

[1] Das *Fluor-de-Lys*-Peptid entspricht in seinem Aufbau dem AMC-Peptid (ac) (s. „Synthetisierte Peptide“). Im weiteren Text werden beide Peptide als „AMC-Peptid“ bezeichnet.

## Puffer und Lösungen

### Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25% (w/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Ethanol	45% (v/v)

### Coomassie-Entfärbelösung

Essigsäure	7% (v/v)
Ethanol	20% (v/v)

### HAT-Reaktionspuffer (HB)

HEPES, pH 7,9	50 mM
EDTA	0,1 mM
BSA	0,005% (w/v)

### HAT-Stopplösung

Ameisensäure	2% (v/v) final
--------------	----------------

### Probenmatrix

CHCA	Gesättigt
ACN	1 Teil
H <sub>2</sub> O / 0,1% TFA	2 Teile

H<sub>2</sub>O für Peptide < 1.000 Da; 0,1% TFA für Peptide > 1.000 Da (basierend auf (147))

### SIRT1-Reaktionspuffer (RB)

Tris-acetat, pH 8	50 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
DTT	5 mM
BSA	0,05% (w/v)

**SIRT1-Stopplösung**

NAM	5 mM final
Ameisensäure	1% (v/v) final

**TBS (10x)**

Tris Base	0,2 M
NaCl	1,37 M

pH-Wert mit HCl auf 7,6 eingestellt

**TBS-T (1x)**

TBS (10x)	10% (v/v)
Tween 20	0,1% (w/v)

**UTL-Matrixlösung** (nach (148))

CHCA	Gesättigt
ACN	2 Teile
H <sub>2</sub> O	1 Teil
0,1% TFA	Final

1 Teil des Überstandes dieser Lösung wurde mit 3 Teilen Isopropanol versetzt.

**Western-Blot Transferpuffer**

Tris Base	25 mM
Glycin	186 mM

**Screeninghits**

NP	Summenformel	Bezeichnung
1	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	2-(3-(3,4'-dihydroxy-2,5-dimethoxybiphenyl-4-yl)-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)acetic acid
2	C <sub>31</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	5',7,7'-trihydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)-5-methoxy-6,8'-bi(4H-chromene)-4,4'-dione

3	$C_{30}H_{18}O_{10}$	8-(5-(5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-2-hydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one
4	$C_{29}H_{24}O_8$	6,8-bis(2,3-dihydroxybenzyl)-5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one
5	$C_{24}H_{25}NO_{10}$	6-(4-(5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl)phenoxy)-5-hydroxy-3-methoxy-2,2-dimethyl-tetrahydro-2H-pyran-4-yl carbamate
6	$C_{57}H_{90}O_{29}$	(2S,3S,4S,5R,6R)-6-((2S,3R,4R,5R,6aR,6bS,8R,8aR,12aS,14bR)-8a-(((2S,3R,4S,5S)-3-((2S,3R,4S,5R,6S)-5-((2S,3R,4S,5R)-4-((2R,3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yloxy)-3,5-dihydroxy-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-3,4-dihydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-2-yloxy)carbonyl)-2,5,8-trihydroxy-4-(hydroxymethyl)-4,6a,6b,11,11,14b-hexamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-icosahdropicen-3-yloxy)-3,4,5-trihydroxy-tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid
7	$C_{19}H_{24}O_9$	2-sec-butyl-5,7-dihydroxy-8-(3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-4H-chromen-4-one
8	$C_{50}H_{75}NO_{17}$	(2S,3S,4S,5R,6R)-6-(((3S,6aR,6bS,8S,8aR,9R,10R,14bR)-8,9-dihydroxy-8a-(hydroxymethyl)-4,4,6a,6b,11,11,14b-heptamethyl-10-(2-(methylamino)benzoyloxy)-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-icosahdropicen-3-yloxy)-3,5-dihydroxy-4-((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid
9	$C_{20}H_{18}O_7$	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)-4H-chromen-4-one

### Synthetisierte Peptide

Peptid	Sequenz	Theoretische Masse (Da)	Quelle
p53-Peptid (ac)	NH <sub>2</sub> -HLKSKKGQSTSRHK-K(Ac)-LMFK-COOH	2311,8	(138)
Fluorescein-Peptid (ac)	5(6)-Fluorescein-NH-HLKSKKGQSTSRHK-K(Ac)-LMFK-COOH	2670,1	modifiziert nach (138)

Non-TAMRA- Peptid (ac)	Acetyl-NH-EE-K(Biotin)-GQSTSSHS- K(Ac)-XSTEGKEE-CONH <sub>2</sub>	2487,6	modifiziert nach (116)
TAMRA- Peptid (ac)	Acetyl-NH-EE-K(Biotin)-GQSTSSHS- K(Ac)-XSTEG-K[5(6)-TAMRA]-EE- CONH <sub>2</sub>	2899,1	(116)
AMC-Peptid (ac)	Acetyl-NH-RHK-K(Ac)-AMC	808,9	(118)
AMC-Peptid (deac)	Acetyl-NH-RHKK-AMC	766,9	modifiziert nach (118)
Histon H4- Peptid (ac)	NH <sub>2</sub> -SGRGKGGKGLGKGGGA-K(Ac)- RHRK-COOH	2034,3	(70)
Histon H4- Peptid (deac)	NH <sub>2</sub> -SGRGKGGKGLGKGGAKRHRK- COOH	1992,3	modifiziert nach (70)
HAT-Peptid (ac)	NH <sub>2</sub> -STSRHK-K(Ac)-L-COOH	998,1	---
HAT-Peptid (deac)	NH <sub>2</sub> -STSRHKKL-COOH	956,1	---

Alle hier aufgeführten Peptide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) bezogen.

AMC: 7-amino-4-methylcoumarin; X: Norleucin

### Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Firma	Bestell-Nr.	Lot-Nr.
Acetyl-p53 (Lys382) Antikörper	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	2525S	10
p53 (DO-1) Antikörper	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	sc-126	D2908

Sekundäre Antikörper	Spezies	Firma	Bestell-Nr.	Lot-Nr.
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	sc-2004	J2811
anti-Maus IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	sc-2005	C2011

### Enzyme

Enzym	Hersteller / Lieferant
SIRT1 ( <i>human, recombinant</i> ) (SE-239)	Biomol International Inc. (Plymouth Meeting, MA, USA) / Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
SIRT1 ( <i>Full length</i> ) (#100617)	BlueSky BioTech (Worcester, MA, USA)
p300, <i>catalytic domain (residues 1284-1673) (human, recombinant)</i>	Biomol International (Plymouth Meeting, MA, USA) / Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)

### Kits

Kit	Hersteller / Lieferant
<i>CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega (Madison, WI, USA)
<i>Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!</i> (88-7346-22)	eBioscience (San Diego, CA, USA)
<i>Hydrogen Peroxide Assay Kit</i> (K265-200)	BioVision (Mountain View, CA, USA)
<i>NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents</i>	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
<i>Pierce 660nm Protein Assay</i> (22660)	Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)
<i>SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit</i> (AK-555) ( <i>Fluor-de-Lys-Methode</i> )	BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA)

## Zelllinien

Zelllinie	Anbieter / Lieferant
HepG2-Zelllinie	ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland)
THP-1-Zelllinie	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)

## Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
150 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	TPP (Trasadingen, Schweiz)
24 Well Zellkulturplatte	Nunc (Wiesbaden, Deutschland)
384 MALDI <i>target plate, ground steel</i>	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
384 Well <i>μClear-Plate, cell culture, white</i> (781098)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
384 Well <i>Microplate, PS, small volume, black</i> (784076)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
6 Well Zellkulturplatte	TPP (Trasadingen, Schweiz)
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	TPP (Trasadingen, Schweiz)
<i>Amersham Hybond ECL nitrocellulose membranes</i>	GE Healthcare (München, Deutschland)
Bioruptor UCD-200 TO	Diagenode (Lüttich, Belgien)
<i>Blotting Paper</i>	Whatman GmbH (Dassel, Deutschland)
<i>Collection Microtube Caps (120 x 8)</i>	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
<i>Collection Microtubes (racked, 10 x 96)</i>	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
<i>EasyPhor PAGE WetBlotter Mini System</i>	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
LAS-1000 Kamera- und Geldokumentationssystem	Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland)
<i>MTP target frame III</i>	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)

<i>Oasis HLB <math>\mu</math>Elution Plate</i>	Waters GmbH (Eschborn, Deutschland)
PTC-200 Peltier <i>Thermal Cycler</i>	MJ Research (Waltham, MA, USA)
POLARstar Omega	BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermowell 96 Well Polypropylen PCR Mikroplatte	Corning Life Sciences (Tewksbury, MA, USA)
Ultraflex II MALDI TOF/TOF Massenspektrometer	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
<i>XCell SureLock Novex Mini Cell</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)

---

## Software

Software	Anbieter
ACD/ChemSketch Freeware, Version 12.01	Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) (Toronto, ON, Canada)
FlexAnalysis Version 3.0 (Build 96)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
FlexControl Version 3.0 (Build 158)	Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Deutschland)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)
Image Reader LAS-1000 Pro V2.61	Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland)
Microsoft Office	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)

---

## Abbildungen

Mit Ausnahme von Abbildung 1-1 wurden alle Abbildungen der vorliegenden Arbeit unter Anwendung der hier angegebenen Software (s. o.) angefertigt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 MALDI-TOF MS-basierte Methode

In dieser Arbeit wurde eine Screeningmethode entwickelt, die sich auf MALDI-TOF MS als Detektionssystem stützt (Abbildung 3-1). Anhand dieser Methode können unabhängig von Fluoreszenzfarbstoffen artefaktfreie Ergebnisse generiert werden.

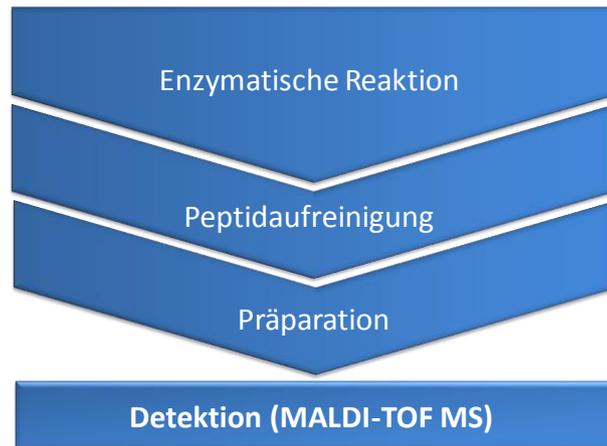


Abbildung 3-1: Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Methode

#### 3.2.1.1 SIRT1-Enzymreaktion

Für die Deacetylierungsreaktion mit dem Enzym SIRT1 wurde zunächst der SIRT1-Reaktionspuffer (RB) mit 0,5  $\mu\text{M}$  des jeweiligen acetylierten Substratpeptides und 120  $\mu\text{M}$  des Cofaktors  $\text{NAD}^+$  versetzt. Aliquots dieser Mischung wurden auf eine 96-Mikrotiterplatte verteilt. Nach Hinzufügen der zu testenden, in DMSO gelösten Substanzen, bzw. von 1% DMSO als Kontrolle, wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 10 nM SIRT1 in RB gestartet. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe der SIRT1-Stopplösung beendet.

Hiervon abweichende Reaktionsbedingungen sowie weitere Besonderheiten der jeweiligen Experimente werden nachfolgend aufgeführt.

Die Bedingungen der SIRT1-Reaktion basieren auf (116) und wurden für die jeweiligen Versuchsansätze optimiert.

### Peptidtest

Für den Test verschiedener Peptide hinsichtlich der möglichen Generierung von Artefakten wurden die Peptide p53-Peptid, Non-TAMRA-Peptid, AMC-Peptid, TAMRA-Peptid und Fluorescein-Peptid verwendet. Die eingesetzte SIRT1-Konzentration betrug 7,5 nM.

### $K_m$ -Wert-Bestimmung

Der  $K_m$ -Wert wurde für das Histon H4-Peptid ermittelt. Dabei betragen die Substratkonzentrationen zwischen 2,5  $\mu$ M und 100  $\mu$ M für das Histon H4-Peptid und 2 mM für den Cofaktor  $NAD^+$ . Die Reaktionen wurden zu mehreren aufeinanderfolgenden Zeitpunkten (0 – 30 min) abgestoppt, indem Aliquots aus den einzelnen Reaktionsansätzen zu Aliquots der SIRT1-Stopplösung pipettiert wurden.

### Enzymkonzentration und Reaktionszeit

Die Optimierung der SIRT1-Konzentration sowie der Reaktionszeit wurde für das Histon H4-Peptid und das AMC-Peptid durchgeführt. Dafür wurde die Deacetylierungsreaktion mit verschiedenen SIRT1-Konzentrationen (5, 10, 20 nM (Histon H4-Peptid) bzw. 25, 50, 100 nM (AMC-Peptid)) durchgeführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 – 60 min) beendet, indem Reaktionsaliquots in Aliquots der Stopplösung überführt wurden.

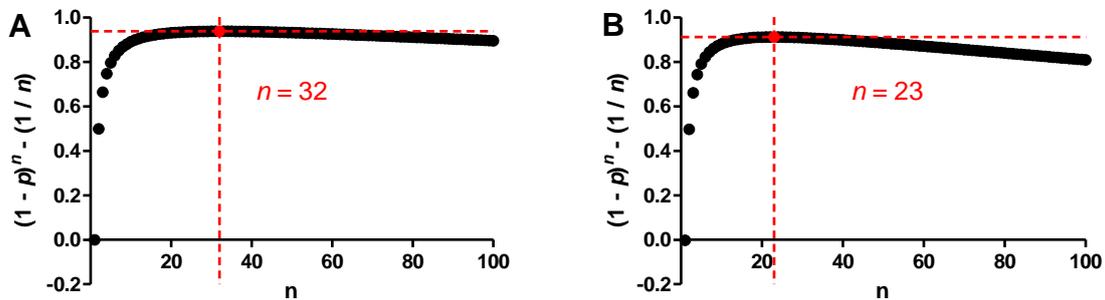
### $Z'$ -Faktor

Der  $Z'$ -Faktor (149) für den Inhibitor-Screeningansatz wurde unter den angegebenen Bedingungen mit dem Histon H4-Peptid bestimmt. Als Negativkontrolle wurden 1% DMSO eingesetzt, als Positivkontrolle 40  $\mu$ M Suramin. Für den artifiziellen Aktivator-Screeningansatz wurden das AMC-Peptid sowie 50 nM SIRT1 eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten in diesem Fall 40  $\mu$ M RSV, als Negativkontrolle 1% DMSO.

### Poolen von Substanzen

Die bestmögliche und effizienteste Größe von Substanzpools für ein Screening kann durch Anwendung der folgenden Gruppentestformel ermittelt werden:  $f(n) = (1 - p)^n - (1 / n)$ . Dabei steht  $p$  für die erwartete Screeninghit-Rate und  $n$  für

die Anzahl der gepoolten Substanzen. Das Maximum der geplotteten Kurve beschreibt die optimale Größe der Substanzpools (Abbildung 3-2). (150)



**Abbildung 3-2: Gruppentest für A)  $p = 0,1\%$  und B)  $p = 0,2\%$**

Das Maximum der auf Basis der Gruppentestformel  $f(n) = (1 - p)^n - (1 / n)$  geplotteten Kurve beschreibt die optimale Größe der Substanzpools. Mit  $p$ : erwartete Screeninghit-Rate;  $n$ : Anzahl der gepoolten Substanzen.

Somit wäre für eine erwartete Screeninghit-Rate von 0,1% eine Poolgröße von 32 Substanzen optimal (Abbildung 3-2, A), bei einer Rate von 0,2% wären hingegen 23 Substanzen pro Pool am effizientesten (Abbildung 3-2, B). Aufgrund dessen wurden Pools aus 5, 10, 20 und 30 Substanzen generiert, die einmal mit DMSO als Negativkontrolle, oder mit Suramin (Histon H4-Peptid) bzw. RSV (AMC-Peptid) als Positivkontrolle versetzt waren. Diese Pools wurden in SIRT1-Reaktionen eingesetzt um zu überprüfen, ob die Positivkontrollen aus Pools dieser Größen als Screeninghits erkennbar sind. Die finalen Konzentrationen der Kontrollen pro SIRT1-Reaktion beliefen sich auf 1% DMSO und 40  $\mu\text{M}$  Suramin bzw. 40  $\mu\text{M}$  RSV. In SIRT1-Reaktionen mit dem Histon H4-Peptid wurden 10 nM SIRT1 eingesetzt, für das AMC-Peptid wurden 50 nM SIRT1 verwendet.

### Screening

Es wurde eine Bibliothek aus 5.500 aufgereinigten Naturstoffen auf SIRT1-Modulatoren gescreent. Im ersten Screeningdurchlauf wurden die Naturstoffe in Pools à fünf Naturstoffe eingesetzt. Die Endkonzentration der einzelnen Naturstoffe in der SIRT1-Reaktion betrug 30  $\mu\text{M}$ , der DMSO Gehalt 1,5%. Im Falle eines Screeninghits wurden die Naturstoffe der jeweiligen Pools anschließend einzeln nachgetestet. Die Naturstoffkonzentration betrug dabei wieder 30  $\mu\text{M}$ , die

DMSO-Konzentration 0,3%. Das Screening wurde sowohl für SIRT1-Inhibitoren (p53-Peptid), als auch für artifizielle SIRT1-Aktivatoren (AMC-Peptid) durchgeführt.

#### IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung

Von den Kontrollsubstanzen Suramin, EX-527 und RSV, sowie von den im Screening gefundenen Hits wurden acht- bis zehn-Punkt-IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-Kurven generiert. Kurven für die Ermittlung von IC<sub>50</sub>-Werten wurden unter Verwendung des Histon H4-Peptides und von 10 nM SIRT1 erstellt. Bei der Ermittlung von EC<sub>50</sub>-Werten wurde das AMC-Peptid verwendet und 50 nM SIRT1 pro Reaktion eingesetzt.

#### 3.2.1.2 p300-Enzymreaktion

Die für die SIRT1-Deacetylierungsreaktion optimierte MALDI-TOF MS-basierte Methode wurde weiterhin auf ihre Anwendbarkeit für die Acetyltransferasereaktion mit p300 getestet.

#### Enzymkonzentration und Reaktionszeit

Für die Optimierung der p300-Konzentration und der Reaktionszeit wurden 0,5 µM des HAT-Peptides und 120 µM des Cofaktors Acetyl-CoA mit dem HAT-Reaktionspuffer (HB) vermischt und diese Mischung mit DMSO versetzt. Durch Zugabe verschiedener p300-Konzentrationen (100 nM, 250 nM, 500 nM) wurden die Reaktionen gestartet und bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 – 60 min) beendet, indem Aliquots der Reaktionsansätze zu Aliquots der HAT-Stopplösung gegeben wurden. Alle Reaktionen enthielten 1% DMSO.

#### IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung

Für die IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung wurden 250 nM p300 in HAT-Reaktionspuffer (HB) mit der zu testenden Substanz bzw. DMSO 30 min bei 30 °C vorinkubiert. Anschließend wurde der Substratmix aus 0,5 µM HAT-Peptid und 120 µM Acetyl-CoA in HB hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe der HAT-Stopplösung beendet. Die Reaktionen enthielten 1% DMSO.

### 3.2.1.3 Peptid-Kalibrationskurve

Die absolute Quantifizierung von Reaktionsproben mittels MALDI-TOF MS erfolgte durch Generierung von Peptid-Kalibrationskurven (CC). Dafür wurden das acetylierte und das deacetylierte Peptid in verschiedenen Verhältnissen (0% - 100% acetyliertes Peptid) in dem jeweiligen Reaktionspuffer gemischt. Außerdem wurden alle in der Reaktion vorhandenen Komponenten hinzugefügt, außer dem Enzym. Anschließend wurden die Proben der CC bezüglich der Aufreinigung, Präparation und Messung entsprechend den Reaktionsproben behandelt.

CCs wurden generiert für die  $K_m$ -Wert-Bestimmung, für die Optimierung der Enzymkonzentrationen und Reaktionszeiten sowie für die  $IC_{50}/EC_{50}$ -Wert-Bestimmungen.

### 3.2.1.4 Peptidaufreinigung

Um die Bildung von Salzaddukten der Peptide zu minimieren und die Probenkristallisation zu optimieren, wurden die Peptide aus dem Reaktionspuffer aufgereinigt. Dafür wurden Oasis HLB  $\mu$ Elutionsplatten (Waters) eingesetzt. Das Sorptionsmittel der 96 Einzelsäulen setzt sich aus hydrophilen und lipophilen Monomeren zusammen und eignet sich somit gut für die Aufreinigung von Peptiden.

Für die Aufreinigung wurde die  $\mu$ Elutionsplatte zunächst an eine Vakuumstation angeschlossen. Dann wurden die Säulen mit 70% Acetonitril (ACN) konditioniert und mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Ladung der Proben auf die Säulen. Durch Waschschrte mit 0.1% TFA und  $H_2O$  wurden schließlich unerwünschte Salze entfernt. Zum Schluss wurden die aufgereinigten Peptide in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mittels 70% ACN von den Säulen eluiert.

### 3.2.1.5 Probenpräparation

Durch Anwendung der optimierten „Ultra-Thin-Layer“ (UTL)-Präparation (148) konnte eine sehr homogene Kristallisation der Proben erzielt werden.

Für die Präparation des UTL wurde zunächst die UTL-Matrixlösung gleichmäßig auf der Oberfläche eines MALDI-Targets verteilt. Die überschüssige Matrix wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels mit einem Tuch entfernt, wodurch eine sehr

dünne Schicht an homogen verteilter Matrix auf der Oberfläche des Targets zurückblieb.

Die optimierte Präparation der Proben erfolgte durch Mischen eines Teils Probe mit vier Teilen Probenmatrix, wobei das Lösungsmittel der Probenmatrix je nach Peptidmasse ausgewählt wurde. (147) Diese Mischung wurde schließlich auf den *UTL* aufgetragen.

### 3.2.1.6 MALDI-TOF MS-Messung

Die Visualisierung der Peptidproben erfolgte durch die Detektion des *m/z*-Verhältnisses der Peptide anhand MALDI-TOF MS am Gerätetyp Ultraflex II (Bruker Daltonik) mit der Software flexControl (Version 3.0, Bruker Daltonik). Die Messungen wurden automatisch (AutoXecute-Software, Bruker Daltonik) und im Positiv-Ionen-Reflektor-Modus durchgeführt. Vor jeder Messung erfolgte die genaue Positionierung des Targets im Gerät („*Teachen*“), eine externe Kalibrierung (Peptidstandard II, Bruker Daltonik) sowie die Einstellung der Laserstärke (21 - 35%) und der Detektorverstärkung (9,9 - 12,5 x). Die Positionierung der Laserschüsse innerhalb eines Probenpunktes erfolgte nach dem Zufallsprinzip („*Random Walk*“).

Für die  $K_m$ -Wert-Bestimmung, die Optimierung von Enzymkonzentrationen und Reaktionszeiten, sowie für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -/ $EC_{50}$ -Werte wurden pro Probenpunkt 1.000 Laserschüsse (10 x 100) anhand der „*fuzzy control*“-Methode addiert. Dies bedeutet, dass 1 x 100 Laserschüsse nur aufsummiert wurden, wenn ein Peak in einem definierten Massenbereich des entstandenen Spektrums folgende Kriterien erfüllte: absolute (min.) Intensität: 800; Signal-Rausch-Verhältnis (S/N): 15; Peakbreite: 0,2. Der definierte Massenbereich beinhaltete dabei jeweils das verwendete Peptid in seinem acetylierten und deacetylierten Zustand.

Für den Peptidtest (Linear-Modus), den  $Z'$ -Faktor, das Poolen von Substanzen, das Screening sowie in Fällen, in denen die „*fuzzy control*“-Methode nicht anwendbar war, wurden 1.000 Laserschüsse ohne weitere Spezifikationen aufsummiert.

### 3.2.1.7 Datenanalyse

Die Peaks wurden anhand eines Skripts (Bruker Daltonik) automatisch markiert (flexAnalysis Software, Version 3.0, Bruker Daltonik). Die relativen Intensitäten der vier höchsten Monoisotopenpeaks von acetyliertem bzw. deacetyliertem Peptid wurden aufsummiert und daraus die prozentuale Acetylierung berechnet. Um eine CC zu generieren, wurde die detektierte prozentuale Acetylierung (experimentell) gegen die entsprechende tatsächliche prozentuale Acetylierung (theoretisch) aufgetragen. Die detektierten prozentualen Acetylierungswerte der Reaktionsproben wurden schließlich unter Anwendung von GraphPad Prism mit der CC interpoliert und so die tatsächlichen prozentualen Acetylierungswerte ermittelt. Für Versuche, bei denen keine CC generiert wurde, wurde aus den Summen der relativen Peakintensitäten das Verhältnis aus deacetyliertem zu acetyliertem Peptid (deac/ac) gebildet.

Für die Analyse der mittels „fuzzy control“ generierten Spektren wurden nur die Spektren herangezogen, bei denen die 1.000 Laserschüsse erfolgreich aufsummiert worden waren. Spektren mit weniger als 1.000 Laserschüssen wurden verworfen, um die Qualität der Ergebnisse nicht zu beeinträchtigen.

#### *K<sub>m</sub>-Wert-Bestimmung*

Die für verschiedene Peptidkonzentrationen ermittelten linearen Anfangsgeschwindigkeiten von SIRT1 wurden gegen die jeweilige Peptidkonzentration aufgetragen. Für die Berechnung des K<sub>m</sub>-Wertes wurde die Michaelis-Menten-Gleichung herangezogen:  $Y = V_{\max} * X / (K_m + X)$ ; mit X: Substratkonzentration; Y: enzymatische Anfangsgeschwindigkeit (GraphPad Prism).

#### *Screening*

Naturstoffe wurden als Screeninghits deklariert, wenn sie im Nachscreening der Einzelsubstanzen die SIRT1-Aktivität so modulierten, dass ein Peakverhältnis von  $\leq 0,1$  (deac/ac) erreicht wurde (Inhibitor-Screening) bzw. wenn eine stärkere Deacetylierung als durch die RSV-Kontrolle vorlag (artifizielles Aktivator-Screening).

Z'-Faktor

Aus den ermittelten Peakverhältnissen der Positiv- und Negativkontrollen wurde der Z'-Faktor nach folgender Formel berechnet (149):

$Z' = 1 - ((3 \times SD_{neg} + 3 \times SD_{pos}) / (AVG_{neg} - AVG_{pos}))$ ; für den Inhibitor-Screeningansatz

$Z' = 1 - ((3 \times SD_{pos} + 3 \times SD_{neg}) / (AVG_{pos} - AVG_{neg}))$ ; für den Aktivator-Screeningansatz

IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Wert-Bestimmung

Wenn IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Werte nicht innerhalb der Anfangsgeschwindigkeit ( $\leq 10\%$  Substratumsatz) eines Enzyms generiert werden, sind sie fehlerbehaftet. Aus diesem Grund wurden die mittels GraphPad Prism generierten IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Werte der untersuchten Substanzen mit einem Umsatzfaktor verrechnet und auf diese Weise die korrekten IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Werte ermittelt. (151)

Die IC<sub>50</sub>'-Werte wurden mit folgender Gleichung ermittelt:

$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ ; mit X: logarithmierte Inhibitorkonzentration; Y: prozentuale Deacetylierung; Top/Bottom: maximale/minimale Reaktion (GraphPad Prism).

Die EC<sub>50</sub>'-Werte wurden mit folgender Gleichung ermittelt:

$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ ; mit X: logarithmierte Aktivorkonzentration; Y: prozentuale Deacetylierung; Top/Bottom: maximale/minimale Reaktion (GraphPad Prism).

Um die jeweiligen Umsatzfaktoren zur IC<sub>50</sub>'-Wert-Bestimmung (IC<sub>50</sub>' / IC<sub>50</sub>) zu generieren, wurde folgende Gleichung angewandt:

$IC_{50}' / IC_{50} = 1 / ((x / 1 - e^{0,5 \ln(1-x)}) - 1)$ ; dabei ist x definiert als der prozentuale Substratumsatz der DMSO-Kontrollreaktion. (151)

Für die Berechnung der Umsatzfaktoren zur EC<sub>50</sub>'-Wert-Bestimmung (EC<sub>50</sub>' / EC<sub>50</sub>) wurde dieselbe Gleichung verwendet, mit dem Unterschied, dass x als der prozentuale Substratumsatz der Reaktion definiert wurde, die mit der höchsten Aktivorkonzentration versetzt war:  $EC_{50}' / EC_{50} = 1 / ((x / 1 - e^{0,5 \ln(1-x)}) - 1)$ .

Durch Multiplikation der experimentell ermittelten IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Werte mit den jeweiligen Umsatzfaktoren wurden die tatsächlichen IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Werte berechnet (Tabelle 3-1). (151)

Tabelle 3-1: IC<sub>50</sub>'-/EC<sub>50</sub>'-Wert Korrektur (basierend auf (151))

Substanz / NP	IC <sub>50</sub> ' bzw. EC <sub>50</sub> ' (µM)	Substratumsatz <sup>[1]</sup>	Umsatzfaktor <sup>[2]</sup>	IC <sub>50</sub> bzw. EC <sub>50</sub> (µM)
Suramin	0,36 ± 0,03	46,83%	1,37	0,27 ± 0,02 <sup>[3]</sup>
EX-527	0,80 ± 0,04	46,83%	1,37	0,58 ± 0,03 <sup>[3]</sup>
1	13 ± 1	43,52%	1,33	9,8 ± 0,7 <sup>[3]</sup>
2	39 ± 13	47,80%	1,38	28 ± 9 <sup>[3]</sup>
3	50 ± 8	46,33%	1,37	36 ± 6 <sup>[3]</sup>
4	63 ± 5	46,33%	1,37	46 ± 4 <sup>[3]</sup>
5	68 ± 4	45,34%	1,35	50 ± 3 <sup>[3]</sup>
RSV	40,2 ± 0,4	95,82%	4,89	8,2 ± 0,1 <sup>[4]</sup>
9	12,0 ± 0,2	90,29%	3,21	3,7 ± 0,1 <sup>[4]</sup>
9	2,3 ± 0,1	45,67%	1,36	1,7 ± 0,1 <sup>[5]</sup>

[1] % Substratumsatz ohne Substanz (DMSO-Kontrolle) für IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung bzw. mit höchster Aktivatorkonzentration für EC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung

[2] Umsatzfaktoren wurden durch Anwendung der folgenden Gleichungen (151) ermittelt:

$IC_{50}' / IC_{50} = 1 / ((x / 1 - e^{0,5 \ln(1-x)}) - 1)$ ; mit x: % Substratumsatz ohne Substanz (DMSO-Kontrolle)

$EC_{50}' / EC_{50} = 1 / ((x / 1 - e^{0,5 \ln(1-x)}) - 1)$ ; mit x: % Substratumsatz mit höchster Aktivatorkonzentration

[3] IC<sub>50</sub>-Wert für SIRT1

[4] EC<sub>50</sub>-Wert für SIRT1

[5] IC<sub>50</sub>-Wert für p300

### 3.2.1.8 Validierungsmethoden

Zur Validierung der MALDI-TOF MS-basierten Methode wurde einerseits ESI MS und andererseits eine auf Radioaktivität basierende Methode eingesetzt.

#### ESI MS

Aliquots der SIRT1-Reaktionen zur Generierung von IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-Kurven für Suramin, EX-527 und RSV wurden bei -20 °C eingefroren und zu Validierungszwecken der Firma BIOCIUS (Woburn, MA, USA) übersandt. Dort

wurden die Proben mittels ESI MS-Technologie (*RapidFire Drug Screening Service*) detektiert.

#### Radioaktivitätsbasierte Methode

Der mittels MALDI-TOF MS generierte IC<sub>50</sub>-Wert für den p300-Inhibitor NP9 wurde durch einen auf Radioaktivität basierenden Versuch (3,08 µM [Acetyl-<sup>3</sup>H]-CoA, 5 µM Histon H3-Peptid) validiert, der von der Firma *Reaction Biology Corp.* (Malvern, PA, USA) durchgeführt wurde.

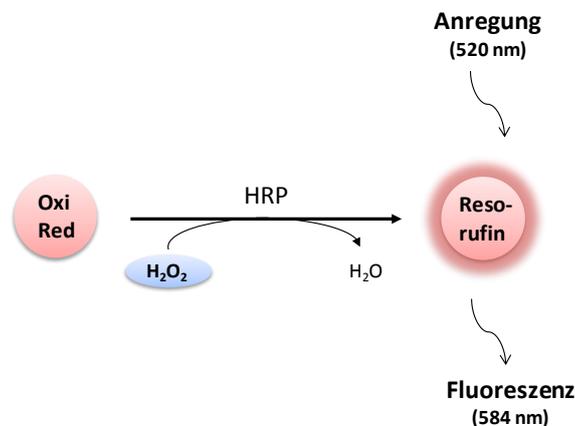
#### **3.2.2 Fluor-de-Lys-Methode**

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein fluoreszenzmarkiertes, acetyliertes Peptidsubstrat (AMC-Peptid; RHK-K(Ac)-AMC) durch das Enzym SIRT1 deacetyliert wird. Durch die Abspaltung des Acetylrestes wird die Bindung zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff AMC und dem Lysinrest für Trypsin zugänglich, wodurch von allen deacetylierten Peptiden das AMC abgespalten werden kann. (117-119) Wird also nach einer definierten Zeitspanne die SIRT1-Reaktion durch Zugabe von NAM abgestoppt, so wird zeitgleich Trypsin zugegeben. Die durch Trypsin freigesetzten AMC-Moleküle werden schließlich in einem Wellenlängenbereich von 350-380 nm angeregt und das emittierte Licht im Bereich von 450-480 nm detektiert. Die gemessene Fluoreszenzintensität steht dabei in direktem Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität von SIRT1 (Abbildung 1-9). (BIOMOL)

Für den Versuch wurde der Substratmix aus 25 µM AMC-Peptid und 25 µM NAD<sup>+</sup> vorgelegt und mit den zu testenden Substanzen bzw. 1% DMSO versetzt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 0,1 U SIRT1 pro Reaktion. Nach einer Inkubation bei 37 °C über einen Zeitraum von 30 min wurde durch Zugabe von 2 mM NAM und Trypsin (1 x Developer II, Biomol) die Reaktion abgestoppt und zeitgleich die Entwicklung des Fluoreszenzsignals initiiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C erfolgte die Fluoreszenzdetektion im POLARstar Omega (BMG Labtech), wobei eine Anregungswellenlänge von 355 nm und eine Emissionswellenlänge von 460 nm eingesetzt wurde.

### 3.2.3 $H_2O_2$ -Detektion

Zur Bestimmung, ob durch die Inkubation von RSV und NP9 in  $HCO_3^-$ -haltigem ddH<sub>2</sub>O  $H_2O_2$  gebildet wird, wurde das *Hydrogen Peroxide Assay Kit* (BioVision) eingesetzt. Das Versuchsprinzip basiert darauf, dass das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) das Substrat OxiRed unter Anwesenheit von  $H_2O_2$  zu dem fluoreszierenden Farbstoff Resorufin oxidiert (Abbildung 3-3). Die detektierte Fluoreszenz gibt dann Aufschluss über die in der Probe vorhandene Menge an  $H_2O_2$ . (BioVision)



**Abbildung 3-3: Reaktionsprinzip der  $H_2O_2$ -Detektion**

Die Substanz OxiRed wird durch das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) unter Anwesenheit von  $H_2O_2$  oxidiert, wodurch die fluoreszierende Substanz Resorufin gebildet wird. Die detektierte Fluoreszenz steht in direktem Zusammenhang mit der vorhandenen  $H_2O_2$ -Menge.

Für den Versuch wurden die in ddH<sub>2</sub>O bzw. in ddH<sub>2</sub>O +  $HCO_3^-$  inkubierten Substanzen RSV und NP9 in eine 384-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit demselben Volumen einer Mischung aus HRP und dem Substrat OxiRed in Reaktionspuffer versetzt. Nach einer zehninütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Fluoreszenzdetektion mittels POLARstar Omega (BMG Labtech) bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 584 nm. Für die absolute Quantifizierung von  $H_2O_2$  in den Reaktionsproben wurde parallel eine Standardkurve generiert.

### 3.2.4 Zellkultur

Die Zellkulturexperimente dienen der weitergehenden Charakterisierung der Screeninghits im biologischen System.

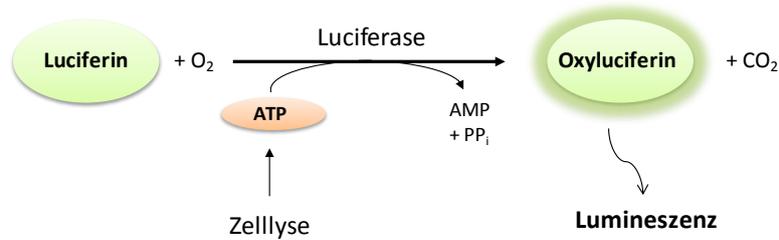
#### 3.2.4.1 Kultivierung und Subkultivierung verschiedener Zelllinien

Die Zelllinie HepG2 (ATCC) ist eine humane Leberkarzinomzelllinie, die aus einem 15-jährigen männlichen Kaukasier isoliert wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und 92% Luftfeuchtigkeit. Das Medium, DMEM (*Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium*) mit 10% FBS (Fötales Bovines Serum), wurde alle 2-3 Tage erneuert. Eine Subkultivierung erfolgte alle 3-4 Tage mittels Trypsinierung durch TrypLE Express.

Bei den THP-1-Zellen (DSMZ) handelt es sich um humane Monocyten, die aus dem peripheren Blutkreislauf eines an akuter monocytischer Leukämie erkrankten einjährigen männlichen Individuums isoliert wurden. Ihre Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 92% Luftfeuchtigkeit in RPMI-1640 Medium mit 10% FBS. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage auf eine Dichte von  $7 - 9 \times 10^4$  Zellen / mL verdünnt.

#### 3.2.4.2 Bestimmung der Zellproliferation

Der Einfluss der Screeninghit-Substanzen und von Etoposid auf die Proliferation von Zellen wurde mithilfe des *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assays* (Promega) bestimmt. Das Versuchsprinzip beruht darauf, dass die über einen gewissen Zeitraum behandelten Zellen lysiert werden, und das darin enthaltene ATP über eine Luciferase-vermittelte Reaktion quantifiziert wird. Dabei oxidiert die Luciferase in einer ATP-abhängigen Reaktion Luciferin, was die Emission von Licht (Lumineszenz) nach sich zieht. Die detektierte Lumineszenz steht somit in direktem Zusammenhang mit dem ATP-Gehalt der Zellen und ermöglicht einen Rückschluss auf die Zellproliferation (Abbildung 3-4). (Promega)



#### Abbildung 3-4: Reaktionsprinzip der Zellproliferationsmessung

Durch das Luciferase-Enzym wird Luciferin unter Anwesenheit von ATP oxidiert. In diesem Prozess wird lumineszierendes Oxyluciferin gebildet. Die detektierte Lumineszenz steht in direktem Zusammenhang mit dem bei der Zelllyse freigesetzten ATP, und somit mit der Proliferation der Zellen.

Für den Versuch wurden  $3,5 \times 10^3$  HepG2-Zellen in DMEM + 10% FBS in eine 384-Mikrotiterplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit einer Konzentrationsreihe der zu testenden Substanzen. Nach einer Inkubationszeit von 22-24 h wurde das CellTiter-Glo Reagenz auf die Zellen gegeben und 10-40 min bei RT inkubiert. Die Lumineszenz wurde anschließend im POLARstar Omega (BMG Labtech) detektiert.

#### 3.2.4.3 Quantifizierung der Proteinacetylierung mittels Western-Blot Analyse

Der Einfluss des im Screening ermittelten, stärksten SIRT1-Inhibitors auf den Acetylierungsstatus des Proteins p53 wurde anhand der Western-Blot Analyse überprüft.

##### 3.2.4.3.1 Zellbehandlung und -ernte

Für diesen Versuch wurden die HepG2-Zellen mit einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten ausgesät und 48 h später mit 30  $\mu$ M NP1 bzw. 0,2% DMSO, sowie mit jeweils 20  $\mu$ M Etoposid behandelt. Die Zellernte erfolgte nach einer Inkubationszeit von 16 h. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in eiskaltem PBS, das mit Inhibitoren für Proteasen (1 x PIC) und für HDACs (5 mM NAM, 10  $\mu$ M TSA) versetzt war, von den Kavitätenflächen abgekratzt. Die auf diese Weise gewonnenen Zellsuspensionen wurden in Reaktionsgefäße überführt, die anschließend bei 4 °C und 1000 x g für einen Zeitraum von 5 min zentrifugiert wurden. Nach Entfernen des Überstandes wurden die gewonnenen Zellpellets bei -80 °C eingefroren.

#### 3.2.4.3.2 Zelllyse und -fraktionierung

Die Zellpellets wurden nach dem Auftauen anhand des Kits *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Pierce) lysiert und in ihre cytosolischen und nucleären Kompartimente aufgetrennt. Dafür wurde das Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Verbesserung des Zellkernaufschlusses wurden die Kernfraktionen zusätzlich für 5 Cycles (30 Sekunden an / 30 Sekunden aus) im Bioruptor (Diagenode) sonifiziert.

#### 3.2.4.3.3 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Proben wurde colorimetrisch anhand des *Pierce 660nm Protein Assays* (Pierce) bestimmt. Die Proben wurden mit dem Reagenz versetzt und die Färbung nach einer Inkubationszeit von 5 min bei einer Wellenlänge von 660 nm im POLARstar Omega (BMG Labtech) detektiert. Anhand einer BSA-Standardkurve (0 – 2 mg/mL) konnte der Proteingehalt der Proben berechnet werden.

#### 3.2.4.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben denaturiert, indem sie mit 1 x NuPAGE *LDS Sample Buffer* (Invitrogen) und 50 mM DTT versetzt und für etwa 10 min auf 70 °C erhitzt wurden. Anschließend erfolgte die Ladung der Proben (4,1 µg Protein pro Probe) auf ein NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen). Als Marker diente die 1:1-Mischung aus einem vorgefärbten Proteinmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, BioRad), der im Gel und auf der Membran sichtbare Banden generiert, und einem Proteinmarker, der erst durch die ECL-Reaktion ein sichtbares Signal erzeugt (*MagicMark XP Western Protein Standard*, Invitrogen). Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (*XCell SureLock Mini Cell*, Invitrogen) unter Verwendung des NuPAGE *MOPS SDS Running Buffers* (Invitrogen).

#### 3.2.4.3.5 Western-Blot und Proteindetektion

Die anhand der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Nassblotsystems (*EasyPhor PAGE WetBlotter Mini System*, Biozym) von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (*Hybond ECL membrane*, GE Healthcare) übertragen. Der Blottingvorgang erfolgte bei konstanten 25 Volt über Nacht. Die

Qualität des Blottingvorgangs wurde direkt nach dem Blotting durch eine Ponceau S-Färbung der Membranen überprüft. Zur Kontrolle der in den Gelen verbliebenen Proteinmengen diente eine Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung.

Nach dem Entfärben der Membranen mit H<sub>2</sub>O wurden diese unter Schütteln 1 h bei RT blockiert und anschließend über Nacht bei 4 °C in der primären Antikörperlösung (acetyl-p53 (Lys382)) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen 3 x 10 min in TBS-T gewaschen und 1 h bei RT in den sekundären Antikörperlösungen inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten für 10 min in TBS-T erfolgte die Detektion der Banden. Dafür wurden die Membranen kurz in einer ECL-Lösung (*Western Lightning Plus-ECL Solution*, Perkin Elmer) geschwenkt und mittels Chemilumineszenz die Bandenintensitäten detektiert (Fuji LAS-1000 Kamera- und Geldokumentationssystem, FUJIFILM Europe GmbH). Nach der Detektion wurden die Membranen 15 min in TBS-T gewaschen und 15 min bei RT gestrippt (*Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer*, Thermo Scientific). Auf diese Weise war es möglich, auf derselben Membran in einem zweiten Durchgang den Gesamtproteingehalt an p53 zu detektieren.

Die Zusammensetzungen und Konzentrationen der Blockier- und Antikörperlösungen sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

**Tabelle 3-2: Übersicht über die verschiedenen Antikörper- (AK-) Lösungen und -Verdünnungen**

1. AK	Blockierlösung	AK-Lösung	1. AK-Verdünnung	2. AK-Verdünnung
<b>Acetyl-p53 (Lys382) Antikörper</b>	5% Milchpulver in TBS-T	5% BSA in TBS-T	1:1000	1:2000
<b>p53 (DO-1) Antikörper</b>	1,5% Milchpulver + 1,5% BSA in TBS-T	1,5% Milchpulver + 1,5% BSA in TBS-T	1:200	1:500

#### 3.2.4.3.6 Datenanalyse

Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm GelAnalyzer 2010a. Die für p53-Ac ermittelten Bandenintensitäten wurden auf die Bandenintensitäten des gesamten p53 Proteins normalisiert.

#### 3.2.4.4 Quantifizierung der TNF $\alpha$ -Freisetzung mittels ELISA

Da sich ein verringerter Acetylierungsstatus von NF $\kappa$ B reprimierend auf die TNF $\alpha$ - (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -) Freisetzung aus THP-1-Zellen auswirken kann (22, 152, 153), wurde überprüft, welchen Einfluss eine Behandlung der Zellen mit dem artifiziellen SIRT1-Aktivator NP9 auf den TNF $\alpha$ -Gehalt des Zellmediums hat.

Um die TNF $\alpha$ -Freisetzung aus den THP-1-Zellen zu testen, wurden 0,4 mL einer THP-1-Zellsuspension mit einer Dichte von  $1,2 \times 10^6$  Zellen / mL in eine Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten ausgesät und 1 h mit 10  $\mu$ M NP9 bzw. 0,2% DMSO vorinkubiert. Dann wurden für weitere 5 h 10 ng/mL LPS (Lipopolysaccharid) zugegeben. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mitsamt dem Medium in Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und  $1.000 \times g$  über einen Zeitraum von 5 min zentrifugiert. Das abgenommene Medium wurde bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Für die Detektion der TNF $\alpha$ -Freisetzung wurde der *Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!* (eBioscience) gemäß Herstellerangaben verwendet.

#### 3.2.5 Statistische Analyse

Die Daten sind für alle nicht zellbasierten Versuche als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt, für alle zellbasierten Versuche als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die statistische Signifikanz wurde definiert als  $p < 0,05$ . Für den Vergleich zweier Proben wurde der ungepaarte *Student's* t-Test eingesetzt. Wurden mehr als zwei Proben mit einer Kontrollprobe verglichen, so wurde die *One-way* ANOVA mit dem *Dunnett's* Post-hoc Test eingesetzt. Wurden mehr als zwei Proben untereinander verglichen, so wurde die *One-way* ANOVA mit dem *Bonferroni's Multiple Comparison* Post-hoc Test eingesetzt (GraphPad Prism).

## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit diene der Ermittlung von Naturstoffen, die sich modulierend auf die Aktivität des Enzyms SIRT1 auswirken. Aufgrund der schwerwiegenden Nachteile vorhandener SIRT1-Screeningmethoden wurde deshalb zunächst eine MALDI-TOF MS-basierte Methode entwickelt, die sowohl zum Screening als auch zur Charakterisierung von Screeninghits eingesetzt werden kann. Diese Methode eröffnet zudem die Möglichkeit eine Reihe weiterer, posttranslational modifizierender Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität zu untersuchen. Die durch das Screening einer Naturstoffbibliothek identifizierten SIRT1-Modulatoren wurden schließlich *in vitro* weitergehend untersucht.

### 4.1 Entwicklung einer MALDI-TOF MS-basierten SIRT1-Screeningmethode

Trotz der inhärenten Vorteile, die die MALDI-TOF MS bezüglich der Detektion der SIRT1-vermittelten Deacetylierungsreaktion aufweist, ist diese Methode auf dem Gebiet der Quantifizierung mit Schwierigkeiten verbunden (s. 1.4.2). Aus diesem Grund wurden einige Entwicklungsschritte unternommen, die die Quantifizierung des Deacetylierungsgrades eines Peptidsubstrates, und dadurch die Bestimmung der SIRT1-Aktivität, ermöglichen. Außerdem wurde die Methode hinsichtlich verschiedener Reaktionsparameter optimiert. Im Anschluss wurde überprüft, ob sich die Methode als HTS-Methode eignet, und ob sie für die weitergehende Charakterisierung von Screeninghits eingesetzt werden kann.

#### 4.1.1 Peptidquantifizierung

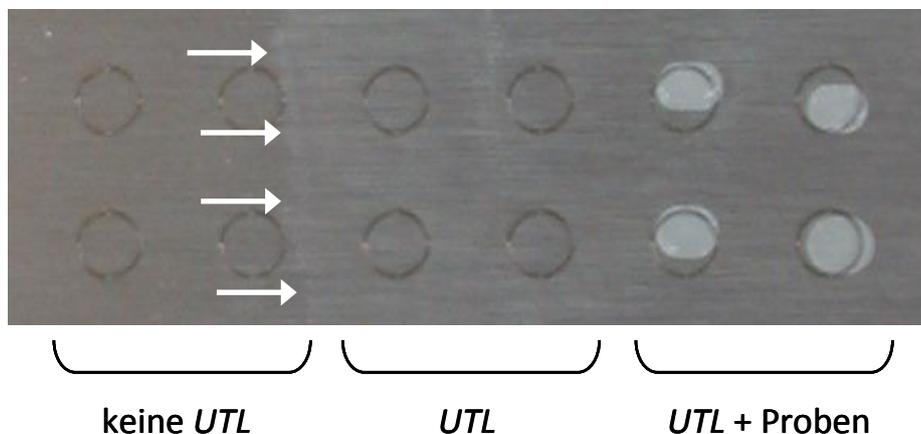
Die Quantifizierbarkeit einer Probe mittels MALDI-TOF MS ist einerseits von der Homogenität des Probenkristalls und andererseits von der Komplexität der Probe abhängig (s. 1.4.2.2). Um eine homogene Verteilung der Proben auf dem Target zu gewährleisten, wurde eine Spezialform der „Thin Layer“-Präparation angewandt. Diese sogenannte „Ultra-Thin-Layer“ (UTL)-Präparation (148) wurde für eine bestmögliche Reproduzierbarkeit der gemessenen Proben optimiert.

Aufgrund der naturgemäß geringen Probenkomplexität im Falle der Deacetylierung eines einzelnen Peptids konnte auf den Einsatz eines internen Standards verzichtet werden. Die Quantifizierung erfolgte allein dadurch, dass das

jeweilige Verhältnis aus den Peakintensitäten des acetylierten und des deacetylierten Peptides gebildet wurde.

#### 4.1.1.1 Optimierung der Präparationsbedingungen

Um eine gleichmäßige Verteilung der Proben auf dem Target zu erzielen, wurde die *UTL*-Präparationstechnik (148) optimiert. Als *UTL*- sowie als Probenmatrix wurde die  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) verwendet, welche sehr homogene Kristallisationseigenschaften aufweist. In Abbildung 4-1 ist das auch optisch gleichmäßige Erscheinungsbild der *UTL*-Präparationstechnik dargestellt.



**Abbildung 4-1: Optisches Erscheinungsbild der *UTL*-Präparation**

Links: Target ohne *UTL*-Präparation; Mitte: Target mit *UTL*-Präparation; rechts: Target mit *UTL*-Präparation sowie Probenmatrix.

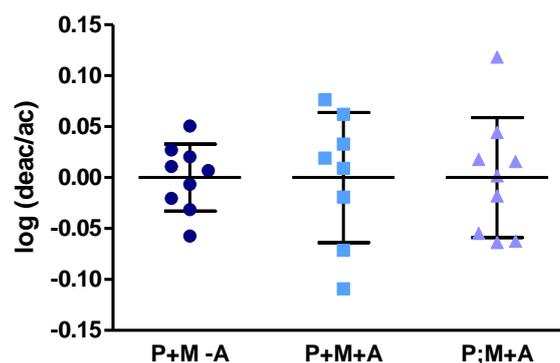
Zu Beginn jeder Präparation wurde zunächst die *UTL*-Matrix auf der Oberfläche des Targets verteilt und nach der Evaporation des Lösungsmittels die überschüssige Matrix mit einem Tuch entfernt. Die so entstandene, sehr dünne *UTL*-Matrixschicht (Abbildung 4-1) diente als homogene Grundlage für eine gleichmäßige Einlagerung der Analyten.

Um eine bestmögliche Reproduzierbarkeit der detektierten Peptidverhältnisse einer Probe zwischen den einzelnen Messungen zu erzielen, wurden für die anschließende Probenpräparation drei Präparationstechniken getestet. Dafür wurden zunächst das acetylierte und das deacetylierte HAT-Peptid äquimolar gemischt. Dann wurden die Proben vor der Präparation mit der Probenmatrix vermischt und erst dann auf das Target aufgetragen. Dabei konnte bei einer Präparationstechnik die gesamte Probe auskristallisieren (P+M-A), bei einer

anderen wurde hingegen das überschüssige Proben-Matrix-Gemisch abgesaugt (P+M+A). Für die dritte Technik wurden nur die Proben auf den *UTL* präpariert und getrocknet, und erst anschließend die Probenmatrix aufgetragen, von welcher der Überschuss abgesaugt wurde (P;M+A) (Abbildung 4-2).

Die Ergebnisse zeigen, dass das einheitlichste Resultat dadurch erzielt wurde, dass die Proben vor der Präparation mit der Probenmatrix gemischt wurden und das gesamte Gemisch auf dem Target auskristallisieren konnte. Hingegen können sowohl durch das getrennte Auftragen von Probe und Probenmatrix, als auch durch das Absaugen überschüssiger Probe bzw. Matrix größere Abweichungen in den detektierten Verhältnissen der Peptidpeaks auftreten (Abbildung 4-2).

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Peptidverhältnisse wurden die Proben folglich vor der Präparation auf den *UTL* mit der Probenmatrix vermischt und auf das Absaugen der überschüssigen Probe verzichtet.

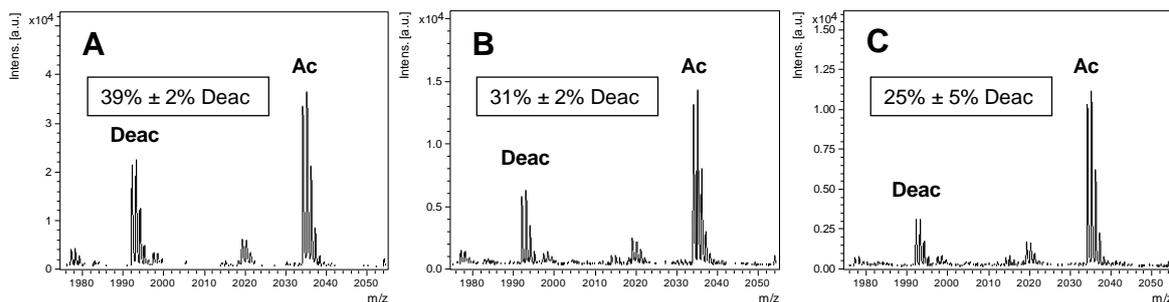


**Abbildung 4-2: Einfluss des Mischens von Probe und Probenmatrix vor der Präparation auf die MALDI-TOF MS Detektion**

Dargestellt sind die mittels MALDI-TOF MS detektierten Peakverhältnisse, berechnet aus den relativen Intensitäten der deacetylierten und acetylierten HAT-Peptidpeaks. Das tatsächliche Mischungsverhältnis der Peptide beträgt 1:1 in H<sub>2</sub>O. **P+M-A:** Probe und **M**atrix vor Präparation gemischt, ohne **A**bsaugen des überschüssigen Präparates; **P+M+A:** Probe und **M**atrix vor Präparation gemischt, mit **A**bsaugen des überschüssigen Präparates; **P;M+A:** separate Präparation von **P**robe und **M**atrix, mit **A**bsaugen der überschüssigen Matrix. Die Einzelwerte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf den jeweiligen Mittelwert einer Präparationsbedingung normalisiert. (n = 8-9; MW ± SD)

#### 4.1.1.2 Peptid-Kalibrationskurve

Um eine absolute Quantifizierung der mittels MALDI-TOF MS detektierten Reaktionsproben zu ermöglichen, ist die Anfertigung einer Kalibrationskurve (CC) notwendig. In diesem Zusammenhang wurde getestet, welchen Einfluss die Lösung, in der die CC-Proben vorbereitet werden, auf die anschließende Detektion der Peptidverhältnisse hat. Dafür wurde das Histon H4-Peptid in seinem acetylierten und deacetylierten Zustand 1:1 in unterschiedlichen Lösungsmitteln vermischt und anschließend, so wie dies auch bei den Reaktionsproben vor jeder Probenpräparation und -messung der Fall war, mittels einer Oasis HLB  $\mu$ Elutionsplatte (Waters) aufgereinigt. Die verwendeten Lösungsmittel waren SIRT1-Reaktionspuffer (RB-), SIRT1-Reaktionspuffer mit Ameisensäure (RB+FA) sowie SIRT1-Reaktionspuffer mit SIRT1-Stopplösung und aller in der SIRT1-Reaktion eingesetzten Reaktionskomponenten (außer SIRT1) (RB+). Dabei war der prozentuale Gehalt an Ameisensäure bei RB+FA und RB+ identisch.



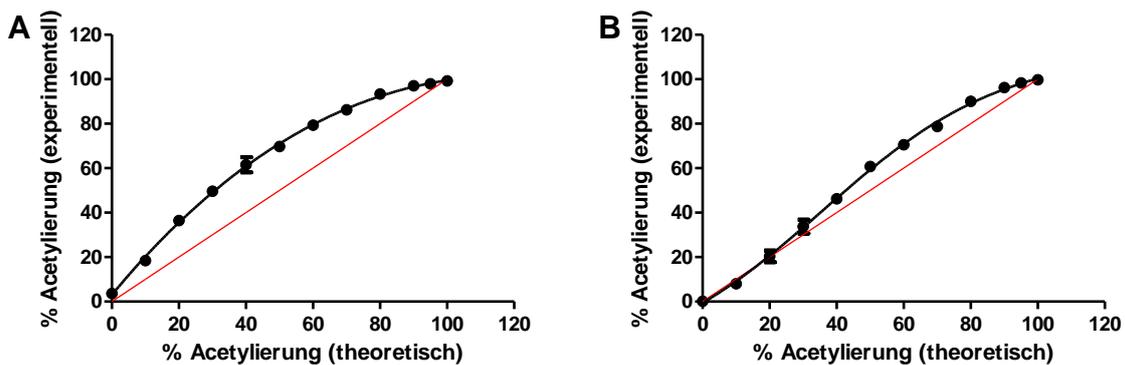
**Abbildung 4-3: Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf das mittels MALDI-TOF MS detektierte Peptidverhältnis**

Dargestellt sind die mittels MALDI-TOF MS detektierten relativen Intensitäten und die daraus berechnete prozentuale Deacetylierung der deacetylierten und acetylierten Histon H4-Peptidpeaks. Das tatsächliche Peptidverhältnis beträgt 50% Ac / 50% Deac. Die jeweiligen Lösungsmittel der Peptide waren A) RB-, B) RB+FA, C) RB+. RB-: SIRT1-Reaktionspuffer; RB+FA: SIRT1-Reaktionspuffer mit Ameisensäure; RB+: SIRT1-Reaktionspuffer mit SIRT1-Stopplösung und allen Reaktionskomponenten (außer SIRT1). (n = 2; MW  $\pm$  SD)

Aus Abbildung 4-3 wird ersichtlich, dass es für die absolute Quantifizierung eines Peptidverhältnisses unerlässlich ist, die CC-Peptidgemische in demselben Puffer herzustellen, in dem auch die Reaktionsproben vorliegen. Es wird deutlich, dass

der jeweilige Puffer großen Einfluss auf das letztendlich detektierte Peptidverhältnis nimmt. So begünstigt das Vorhandensein von Ameisensäure die Detektion des acetylierten Peptides (Abbildung 4-3; B vs. A und C vs. A), aber auch die anderen im Reaktionsgemisch anwesenden Bestandteile haben Einfluss auf das Peakverhältnis (Abbildung 4-3; C vs. B).

In Abbildung 4-4 sind repräsentative CCs für das Histon H4-Peptid sowie für das AMC-Peptid dargestellt. Die Peptidgemische für die einzelnen Punkte der CC wurden dafür in RB+-Puffer generiert und anschließend mit einer Oasis HLB  $\mu$ Elutionsplatte aufgereinigt. Nach der Messung wurde die tatsächliche prozentuale Acetylierung (theoretisch) der Peptide gegen die gemessene prozentuale Acetylierung (experimentell) aufgetragen.



**Abbildung 4-4: Kalibrationskurven unterschiedlicher Peptide**

Dargestellt sind repräsentative Kalibrationskurven (schwarz) des A) Histon H4-Peptides und des B) AMC-Peptides sowie jeweils eine Hilfslinie (rot), anhand welcher die Abweichungen von der theoretischen prozentualen Acetylierung verdeutlicht werden. Die Peptidgemische für die einzelnen CC-Punkte wurden in RB+-Puffer generiert und anschließend mithilfe einer Oasis HLB  $\mu$ Elutionsplatte (Waters) aufgereinigt. RB+: SIRT1-Reaktionspuffer mit Abstopplösung und allen Reaktionskomponenten (außer SIRT1). (n = 11-12; MW  $\pm$  SD)

Die CCs beider Peptide weisen unterschiedliche Kurvenverläufe auf. Die CC für das Histon H4-Peptid besitzt eine gewölbte Kurvenform, die nach oben hin zunehmend abflacht. Diese Kurvenform bestätigt die durchgehend bessere Detektierbarkeit des acetylierten Histon H4-Peptides im Gegensatz zu seiner deacetylierten Form unter den gegebenen Pufferbedingungen.

Das AMC-Peptid weist hingegen eine leicht sigmoidal geformte CC auf. Dies rührt daher, dass erst im oberen Teil der Kurve eine leichte Wölbung auftritt. Für das AMC-Peptid ist somit der Unterschied in der Detektierbarkeit zwischen acetyliertem und deacetyliertem Peptid nicht so ausgeprägt wie für das Histon H4-Peptid.

Bei absoluten Quantifizierungsansätzen besteht somit die Notwendigkeit, für jedes Peptid eine CC zu generieren. Dabei sollte die jeweilige CC unter möglichst ähnlichen Bedingungen wie die Reaktionsproben erstellt werden.

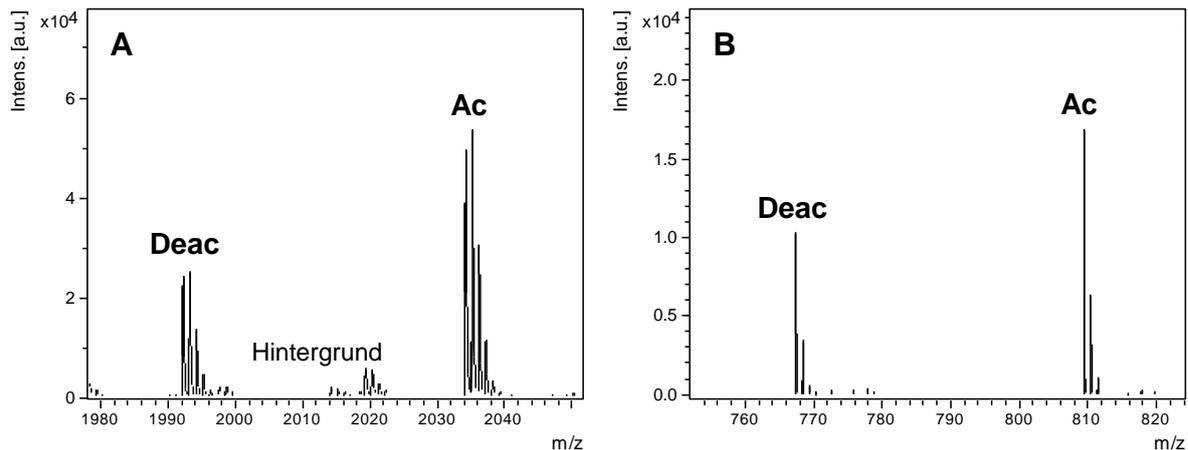
#### **4.1.2 Auswahl eines geeigneten Peptidsubstrates**

Auch bei der Wahl eines geeigneten Peptidsubstrates für die SIRT1-Deacetylierungsreaktion müssen verschiedene Kriterien erfüllt werden. So müssen die Peptide einerseits gut durch das MALDI-TOF MS-System detektierbar, andererseits aber auch ein geeignetes Substrat für die SIRT1-Reaktion sein.

##### 4.1.2.1 Detektion

Die Detektierbarkeit eines Peptides mittels MALDI-TOF MS war in der vorliegenden Arbeit Voraussetzung für dessen Eignung als Substrat in der SIRT1-Deacetylierungsreaktion.

Beide in der Methodenoptimierung eingesetzten Peptidpaare wiesen eine gute Detektierbarkeit auf. Dies machte sich bei dem AMC-Peptid etwa dadurch bemerkbar, dass eine relativ geringe Laserstärke (21 - 22%) für die Messung notwendig war. Dagegen war das Histon H4-Peptid etwas schlechter detektierbar; durch eine Optimierung der Laserstärke (28 - 35%) sowie der Detektorverstärkung konnten jedoch einwandfrei auswertbare Peakspektren generiert werden, die lediglich etwas stärkere Hintergrundsignale aufwiesen als die Peakspektren des AMC-Peptides (Abbildung 4-5).



**Abbildung 4-5: Einfluss der Detektierbarkeit eines Peptides auf das Auftreten von Hintergrundsignalen**

Dargestellt sind die mittels MALDI-TOF MS detektierten Peptidpaare des A) Histon H4-Peptides und des B) AMC-Peptides. Da das Histon H4-Peptid eine geringfügig schlechtere Detektierbarkeit als das AMC-Peptid aufweist, sind in Spektrum A etwas stärkere Hintergrundsignale sichtbar.

#### 4.1.2.2 Fluoreszenzmarkierung

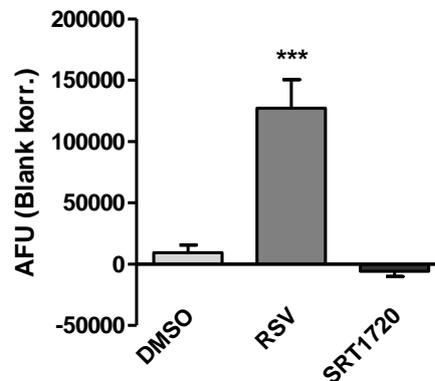
Neben der guten Detektierbarkeit eines Peptides ist jedoch auch die Generierung artefaktfreier Ergebnisse von Bedeutung. So wurde von mehreren Arbeitsgruppen berichtet, dass eine Aktivierung von SIRT1 durch kleine Moleküle nur durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Peptide beobachtet werden kann. (118-121)

Dies wurde in der vorliegenden Arbeit anhand zweier unterschiedlicher Detektionsmethoden überprüft. Die beiden als SIRT1-Aktivatoren deklarierten Substanzen RSV (115) und SRT1720 (116) wurden zunächst durch die fluoreszenzbasierte *FdL*-Methode (s. 1.2.4.2.2) auf ihre Aktivierungseigenschaften bezüglich SIRT1 untersucht. Anschließend wurden die Substanzen in SIRT1-Reaktionen mit diversen fluoreszenzmarkierten oder unmarkierten Peptidsubstraten eingesetzt, und ihr Einfluss auf die SIRT1-Aktivität anhand der MALDI-TOF MS-basierten Methode ermittelt.

##### 4.1.2.2.1 Fluor-de-Lys Methode

Die *FdL*-Methode ist eine häufig angewendete, fluoreszenzbasierte SIRT1-Screeningmethode, anhand welcher RSV als SIRT1-aktivierende Substanz ermittelt wurde. (115) Das dabei verwendete Peptid besteht aus einer kurzen Sequenz des Proteins p53, welche an den Fluoreszenzfarbstoff AMC gekoppelt ist

(Abbildung 1-9). Anhand dieser Methode wurde der Einfluss von RSV und SRT1720 auf die SIRT1-Aktivität überprüft.



**Abbildung 4-6: Überprüfung der SIRT1-Aktivierung durch RSV und SRT1720 mittels *FdL*-Methode**

Anhand der fluoreszenzbasierten *FdL*-Methode wurde die Aktivierung von SIRT1 durch die als SIRT1-Aktivatoren deklarierten Substanzen RSV und SRT1720 überprüft. Die Reaktionen enthielten 100  $\mu$ M RSV bzw. 100  $\mu$ M SRT1720, Kontrollreaktionen enthielten 1% DMSO. (n = 5; MW  $\pm$  SD; \*\*\*, p < 0,001 vs. DMSO)

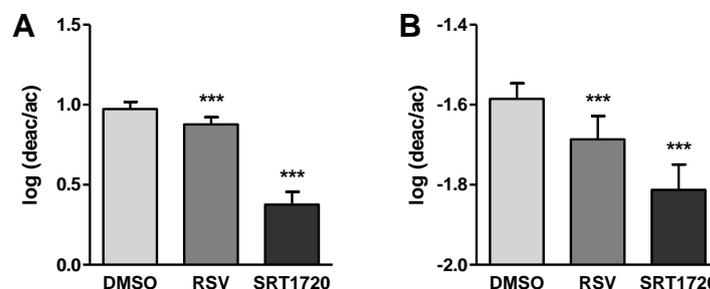
Aus Abbildung 4-6 wird ersichtlich, dass RSV in der *FdL*-Methode einen aktivierenden Effekt auf die Aktivität von SIRT1 ausübt, während durch SRT1720 keine Aktivierung des Enzyms hervorgerufen wird. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Veröffentlichung von Milne *et al.*, in welcher SRT1720 im Vergleich zu RSV als vielfach stärkerer SIRT1-Aktivator beschrieben wird. (116)

Allerdings wurde in der genannten Studie ein Peptid verwendet, das sich sowohl in seiner Aminosäuresequenz als auch durch seinen Fluoreszenzfarbstoff von dem Peptid der *FdL*-Methode unterscheidet. Aus diesem Grund erfolgte anschließend mittels MALDI-TOF MS die Überprüfung von RSV und SRT1720 sowohl mit den Peptiden der *FdL*-Methode (AMC-Peptid) und aus (116) (TAMRA-Peptid), als auch mit einer Reihe weiterer Peptidsubstrate.

#### 4.1.2.2.2 MALDI-TOF Methode

Um die Aktivierung von SIRT1 durch RSV und SRT1720 unter Anwendung verschiedener Peptidsubstrate überprüfen zu können, wurde MALDI-TOF MS als Detektionsmethode eingesetzt. Es wurden fünf verschiedene Peptide getestet,

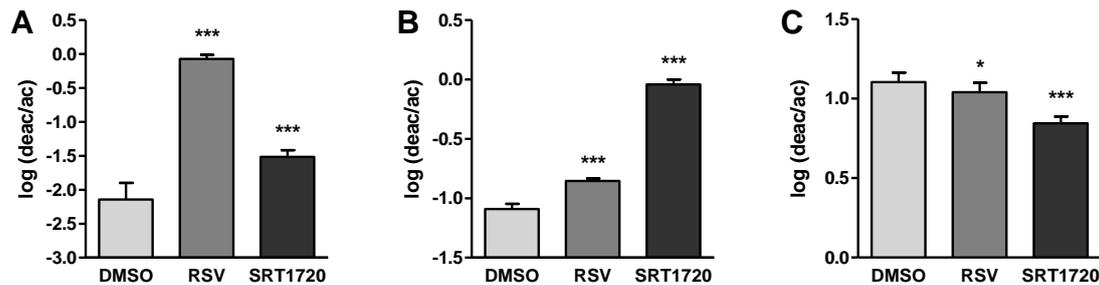
davon drei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (AMC-, TAMRA-, Fluorescein-Peptid), sowie zwei ohne eine solche Markierung (p53-, Non-TAMRA-Peptid).



**Abbildung 4-7: Überprüfung der SIRT1-Aktivierung durch RSV und SRT1720 mit Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung mittels MALDI-TOF MS-basierter Methode**

Anhand der MALDI-TOF MS-basierten Methode wurde die Aktivierung von SIRT1 durch RSV und SRT1720 unter Verwendung nicht fluoreszenzmarkierter Peptide (A: p53-Peptid, B: Non-TAMRA-Peptid) überprüft. Die Reaktionen enthielten 100  $\mu$ M RSV bzw. 100  $\mu$ M SRT1720, Kontrollreaktionen enthielten 1% DMSO. (n = 12; MW  $\pm$  SD; \*\*\*, p < 0,001 vs. DMSO)

Bei Anwendung der beiden Peptidsubstrate ohne Fluoreszenzfarbstoff (p53-Peptid, Non-TAMRA-Peptid) ist keine SIRT1-Aktivierung durch RSV oder SRT1720 erkennbar. Im Gegensatz dazu kann sogar eine Hemmung des Enzyms unter den angegebenen Reaktionsbedingungen detektiert werden (Abbildung 4-7). Bei den fluoreszenzmarkierten Peptiden ergibt sich ein differenzierteres Bild (Abbildung 4-8). RSV und SRT1720 üben sowohl unter Einsatz des AMC-Peptides als auch des TAMRA-Peptides einen aktivierenden Effekt auf SIRT1 aus. Dabei fällt jedoch unter Verwendung des AMC-Peptides die SIRT1-Aktivierung durch RSV deutlich stärker aus als durch SRT1720. Für das TAMRA-Peptid zeichnet sich der gegenteilige Effekt ab, hier ist SRT1720 der stärkere Aktivator des Enzyms. Dies erklärt auch die Beobachtungen von Milne *et al.*, die SRT1720 verglichen mit RSV als den stärkeren SIRT1-Aktivator beschreiben. (116) Für das Fluorescein-markierte Peptid konnte hingegen keinerlei SIRT1-Aktivierung festgestellt werden, sondern lediglich inhibitorische Effekte wie bei den nicht fluoreszenzmarkierten Peptiden.



**Abbildung 4-8: Überprüfung der SIRT1-Aktivierung durch RSV und SRT1720 mit fluoreszenzmarkierten Peptiden mittels MALDI-TOF MS-basierter Methode**

Anhand der MALDI-TOF MS-basierten Methode wurde die Aktivierung von SIRT1 durch RSV und SRT1720 unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Peptide (A: AMC-Peptid, B: TAMRA-Peptid, C: Fluorescein-Peptid) überprüft. Die Reaktionen enthielten 100  $\mu$ M RSV bzw. 100  $\mu$ M SRT1720, Kontrollreaktionen enthielten 1% DMSO. (n = 12; MW  $\pm$  SD; \*, p < 0,05 vs. DMSO; \*\*\*, p < 0,001 vs. DMSO)

Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass eine SIRT1-Aktivierung nur detektiert werden kann, wenn das Substratpeptid eine Fluoreszenzmarkierung aufweist. (118-121) Außerdem wird deutlich, dass das Ausmaß der SIRT1-Aktivierung durch eine Substanz von der Wahl des eingesetzten Peptidsubstrates abhängig ist. Weiterhin wird nicht durch jedes fluoreszenzmarkierte Peptid eine SIRT1-Aktivierung hervorgerufen.

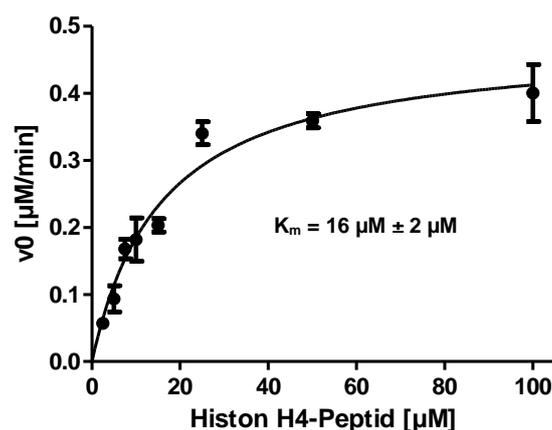
Die MALDI-TOF MS bietet den Vorteil, dass man den Acetylierungsstatus von Peptiden detektieren kann, ohne auf eine Fluoreszenzmarkierung derselben angewiesen zu sein. Aus diesem Grund wurde eine MALDI-TOF MS-basierte Screeningmethode entwickelt, die für zwei unterschiedliche Peptidsubstrate optimiert wurde: für ein unmarkiertes Peptid zur Detektion von SIRT1-Inhibitoren, sowie für ein fluoreszenzmarkiertes Peptid zur Ermittlung artifizieller SIRT1-Aktivatoren.

#### 4.1.3 Optimierung der Peptidkonzentration

Bei der Ermittlung enzymatischer Inhibitoren stehen häufig kompetitiv agierende Substanzen, die mit dem Peptidsubstrat um die Bindungsstelle am Enzym konkurrieren, im Fokus der Suche. Um einen Screeningansatz möglichst sensitiv für die Bestimmung solcher kompetitiven Inhibitoren zu gestalten, ist es daher essentiell, die Konzentration des Peptidsubstrates gering zu halten. Auf diese

Weise können auch schwächere Inhibitoren detektiert werden. Bei der Wahl der Konzentration eines Peptidsubstrates in einem Screening orientiert man sich häufig an dem  $K_m$ -Wert des Peptides zum Enzym. (151) Der  $K_m$ -Wert steht in Zusammenhang mit der Dissoziationskonstanten  $K_d$  und lässt somit Rückschlüsse auf die Substrataffinität zu. (154) Deshalb sollte für die Ermittlung kompetitiver Inhibitoren der  $K_m$ -Wert des Substrates deutlich unterschritten werden. (151)

Aufgrund dessen wurde der  $K_m$ -Wert des natürlichen, unmarkierten Histon H4-Peptides zu SIRT1 ermittelt. Der detektierte  $K_m$ -Wert beträgt  $16 \mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$  (Abbildung 4-9). Die Peptidkonzentration für das Inhibitor-Screening wurde mit  $0,5 \mu\text{M}$  in Anlehnung an (116) schließlich so gewählt, dass diese weit unterhalb des  $K_m$ -Wertes liegt und sich im linearen Detektionsbereich des MALDI-TOF MS befindet. Dies macht die Methode überaus sensitiv für die Detektion kompetitiver Inhibitoren.



**Abbildung 4-9:  $K_m$ -Wert-Bestimmung des Histon H4-Peptides zu SIRT1**

Mittels MALDI-TOF MS wurde der  $K_m$ -Wert des Histon H4-Peptides zu SIRT1 bestimmt. Dafür wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Reaktion bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen bestimmt und gegen die jeweilige Peptidkonzentration aufgetragen. Die Reaktionen enthielten 1% DMSO. ( $n = 3$ ; MW  $\pm$  SD)

Der Aktivierungsmechanismus der SRT-Substanzen sowie von RSV basiert auf einer Verringerung des  $K_m$ -Wertes des jeweiligen Peptidsubstrates zu SIRT1. (115, 116) Wird in einem Screening für artifizielle SIRT1-Aktivatoren eine Peptidkonzentration eingesetzt, die deutlich kleiner als der  $K_m$ -Wert des Peptides ist, ist die enzymatische Aktivität zunächst gering, und eine Aktivitätssteigerung

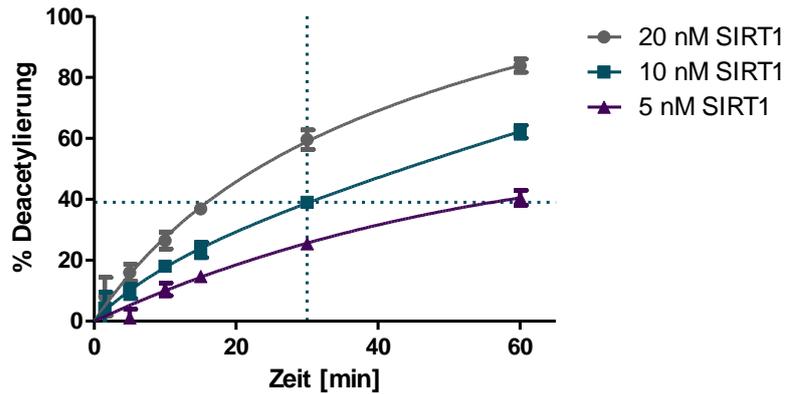
aufgrund einer  $K_m$ -Wert-Verringerung wird auch für schwache artifizielle Aktivatoren deutlich sichtbar. Das Screening wird auf diese Weise sensitiver.

Somit wurde auch für die Ermittlung artifizieller SIRT1-Aktivatoren durch das AMC-Peptid mit  $0,5 \mu\text{M}$  gemäß (116) eine Peptidkonzentration gewählt, die sich weit unter dem  $K_m$ -Wert des AMC-Peptides zu SIRT1 befindet und im linearen Detektionsbereich des MALDI-TOF MS liegt. Dafür wurden in der Literatur vorhandene  $K_m$ -Werte herangezogen ( $64 \mu\text{M}$  (115);  $87,6 \mu\text{M} \pm 19,7 \mu\text{M}$  (119)).

#### **4.1.4 Optimierung von Enzymkonzentration und Reaktionszeit**

Nach Festlegung der jeweiligen Peptidkonzentrationen wurde getestet, welche SIRT1-Konzentrationen und welche Reaktionszeiten benötigt werden, um optimale Reaktionsbedingungen für die beiden Screeningansätze zu schaffen.

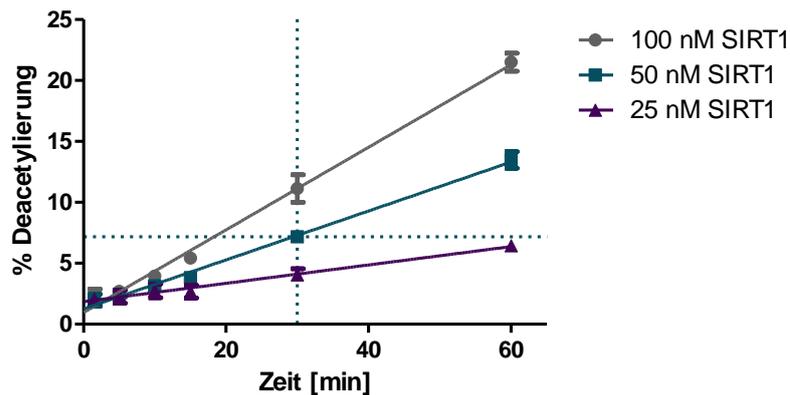
Für die Detektion von SIRT1-Inhibitoren wurde eine basale prozentuale Deacetylierung von ca. 40% als optimaler Ausgangspunkt gewählt. Ein solch großes Detektionsfenster (0% - 40% Deacetylierung) ermöglicht im Screeningansatz die Visualisierung verschieden starker Inhibitoren, sowie verschiedener Inhibitorkonzentrationen bei der  $IC_{50}$ -Wert-Bestimmung. Um sowohl Enzym (20 nM SIRT1; 15 min) als auch Zeit (5 nM SIRT1; 60 min) einzusparen, wurde eine Inkubation des Histon H4-Peptides für 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  mit 10 nM SIRT1 gewählt, um eine prozentuale Deacetylierung von 40% zu erzielen (Abbildung 4-10).



**Abbildung 4-10: Bestimmung von SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für das Histon H4-Peptid**

Mittels MALDI-TOF MS wurden die optimale SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für das Histon H4-Peptid bestimmt. Dafür wurde die prozentuale Deacetylierung des Histon H4-Peptides nach Einsatz unterschiedlicher SIRT1-Konzentrationen (5 nM, 10 nM, 20 nM) zu verschiedenen Zeitpunkten (0-60 min) bestimmt und gegen die jeweilige Reaktionszeit aufgetragen. Die Reaktionen enthielten 1% DMSO. (n = 3-12; MW ± SD)

Für die Detektion artifizierlicher SIRT1-Aktivatoren wurde die basale prozentuale Deacetylierung mit weniger als 10% gering gewählt, sodass das Detektionsfenster nach oben hin einen großen Spielraum aufweist (10% - 100% Deacetylierung). Dieser Ausgangswert wurde erreicht, indem das AMC-Peptid mit 50 nM SIRT1 bei 37 °C 30 min lang inkubiert wurde (Abbildung 4-11).



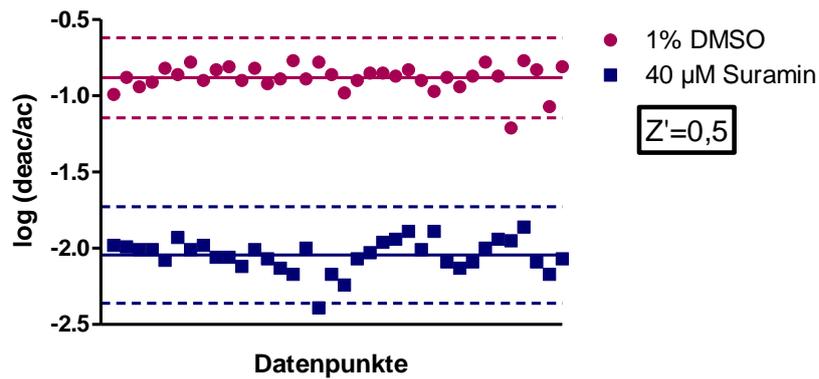
**Abbildung 4-11: Bestimmung von SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für das AMC-Peptid**

Mittels MALDI-TOF MS wurden die optimale SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für das AMC-Peptid bestimmt. Dafür wurde die prozentuale Deacetylierung des AMC-Peptides nach Einsatz unterschiedlicher SIRT1-Konzentrationen (25 nM, 50 nM, 100 nM) zu verschiedenen Zeitpunkten (0-60 min) bestimmt und gegen die jeweilige Reaktionszeit aufgetragen. Die Reaktionen enthielten 1% DMSO. (n = 12; MW  $\pm$  SD)

#### 4.1.5 Qualitätsprüfung der Screeningmethode

Mithilfe des Z'-Faktors wurde ermittelt, ob die festgelegten Reaktionsbedingungen für einen Screeningansatz geeignet sind. Der Z'-Faktor ist ein Qualitätsparameter, anhand dessen die Robustheit einer Screeningmethode beurteilt werden kann. (149)

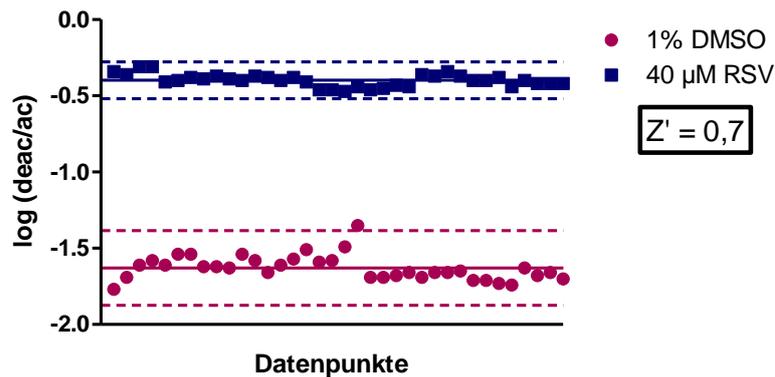
Durch eine 30-minütige Reaktion von 10 nM SIRT1 mit 0,5  $\mu$ M des Histon H4-Peptides bei 37 °C wurde der Z'-Faktor für den Screeningansatz für SIRT1-Inhibitoren bestimmt. Als Kontrollsubstanzen wurden 1% DMSO (Negativkontrolle) und 40  $\mu$ M Suramin (Positivkontrolle) verwendet. Der ermittelte Z'-Faktor von 0,5 belegt die Robustheit der optimierten Versuchsbedingungen für diesen Screeningansatz (Abbildung 4-12).



#### Abbildung 4-12: Bestimmung des Z'-Faktors für das Histon H4-Peptid

Mittels MALDI-TOF MS wurde der Z'-Faktor für den SIRT1-Inhibitor-Screeningansatz unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen (0,5 µM Histon H4-Peptid; 10 nM SIRT1; 30 min; 37 °C) bestimmt. Als Kontrollsubstanzen dienten 1% DMSO (Positivkontrolle) und 40 µM Suramin (Negativkontrolle). MW: durchgezogene Linien; 3 x SD: gestrichelte Linien. (n = 36)

Der Screeningansatz für artifizielle SIRT1-Aktivatoren wurde auf seine Robustheit überprüft, indem 0,5 µM des AMC-Peptides bei 37 °C für 30 min mit 50 nM SIRT1 versetzt wurden. Als Kontrollsubstanzen dienten 1% DMSO (Negativkontrolle) und 40 µM RSV (Positivkontrolle). Der Z'-Faktor für diese optimierten Reaktionsbedingungen betrug 0,7, was die hohe Stabilität dieses Screeningansatzes belegt (Abbildung 4-13).



#### Abbildung 4-13: Bestimmung des Z'-Faktors für das AMC-Peptid

Mittels MALDI-TOF MS wurde der Z'-Faktor für den artifiziellen SIRT1-Aktivator-Screeningansatz unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen (0,5 µM AMC-Peptid; 50 nM SIRT1; 30 min; 37 °C) bestimmt. Als Kontrollsubstanzen dienten 1% DMSO (Negativkontrolle) und 40 µM RSV (Positivkontrolle). MW: durchgezogene Linien; 3 x SD: gestrichelte Linien. (n = 36)

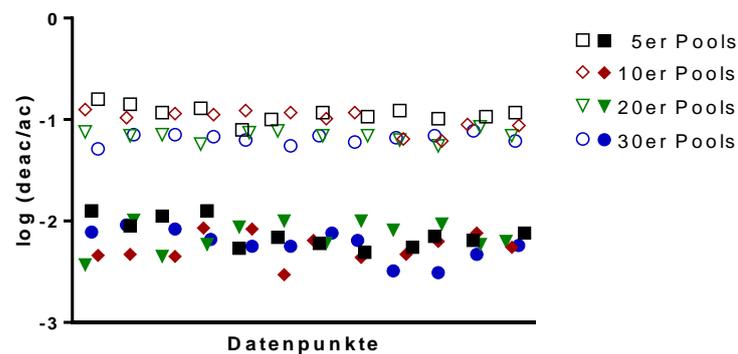
#### 4.1.6 Hochdurchsatz-Screening

Um ein Screening von mehreren tausend Substanzen so effizient wie möglich zu gestalten, kann eine definierte Anzahl der zu untersuchenden Substanzen jeweils in einem sogenannten „Pool“ vermischt und auf diese Weise getestet werden. Die Substanzen aus positiv getesteten Pools werden anschließend einzeln nachgetestet. Dadurch kann der Zeit- und Kostenaufwand im Vergleich zum Screening von Einzelsubstanzen deutlich reduziert werden. Im Vorfeld eines Screenings kann die bestmögliche Poolgröße durch Anwendung einer Gruppentestformel (150) definiert werden, in welcher die erwartete Screeninghit-Rate die entscheidende Variable darstellt. Eine Screeninghit-Rate von 0,1% ergibt etwa eine optimale Poolgröße von 32 Substanzen, wird hingegen eine Hitrate von 0,2% erwartet, sollten die Pools sich auf eine Größe von 23 Substanzen belaufen (s. Abbildung 3-2).

In diesem Kontext wurde überprüft, ob die MALDI-TOF MS-basierte Methode geeignet ist, SIRT1-modulierende Substanzen aus Pools solcher Größe sicher zu identifizieren. Dafür wurden Substanzpools unterschiedlicher Größe (5, 10, 20 oder 30 Substanzen pro Pool) gebildet, die jeweils eine Positiv- oder eine Negativkontrolle enthielten. Von den übrigen Substanzen war dabei bekannt, dass sie keine SIRT1-modulierenden Eigenschaften aufweisen. Anschließend wurde

getestet, ob die mit einer Positivkontrolle versehenen Pools die SIRT1-Aktivität unter den optimierten Reaktionsbedingungen ausreichend modulieren, um diese von den negativen Pools deutlich unterscheiden zu können.

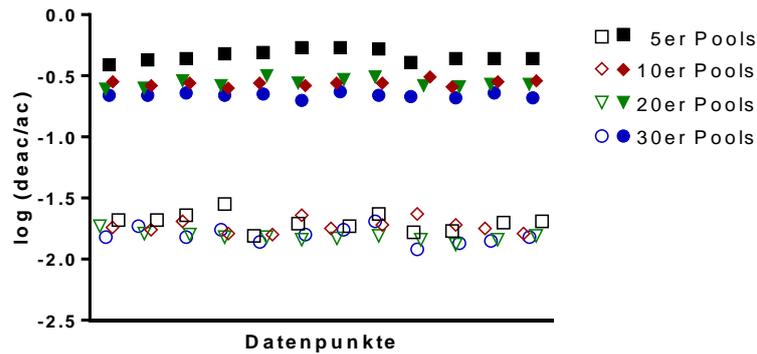
Zu diesem Zweck wurden für den Screeningansatz für SIRT1-Inhibitoren die jeweiligen Pools mit 40  $\mu\text{M}$  Suramin als Positivkontrolle bzw. mit 1% DMSO als Negativkontrolle versetzt. Für alle Poolgrößen waren die positiven Pools eindeutig als Hits erkennbar (Abbildung 4-14).



**Abbildung 4-14: Detektion des SIRT1-Inhibitors Suramin aus Substanzpools unterschiedlicher Größe mittels MALDI-TOF MS**

Es wurde überprüft, ob die MALDI-TOF MS-basierte Methode unter den für den Inhibitor-Screeningansatz optimierten Reaktionsbedingungen dafür geeignet ist, den Inhibitor Suramin aus Substanzpools verschiedener Größe (5, 10, 20 oder 30 Substanzen pro Pool) zu identifizieren. Die Pools jeder Größe waren entweder mit 1% DMSO (Negativkontrolle; leere Symbole) oder mit 40  $\mu\text{M}$  Suramin (Positivkontrolle; volle Symbole) versetzt. (n = 12)

Auch im Screeningansatz für artifizielle SIRT1-Aktivatoren konnten die Pools mit 40  $\mu\text{M}$  RSV als Positivkontrolle deutlich als Hits von den 1% DMSO enthaltenden Pools unterschieden werden (Abbildung 4-15).



**Abbildung 4-15: Detektion des artifiziellen SIRT1-Aktivators RSV aus Substanzpools unterschiedlicher Größe mittels MALDI-TOF MS**

Es wurde überprüft, ob die MALDI-TOF MS-basierte Methode unter den für den artifiziellen Aktivator-Screeningansatz optimierten Reaktionsbedingungen dafür geeignet ist, den artifiziellen Aktivator RSV aus Substanzpools verschiedener Größe (5, 10, 20 oder 30 Substanzen pro Pool) zu identifizieren. Die Pools jeder Größe waren entweder mit 1% DMSO (Negativkontrolle; leere Symbole) oder mit 40  $\mu$ M RSV (Positivkontrolle; volle Symbole) versetzt. ( $n = 12$ )

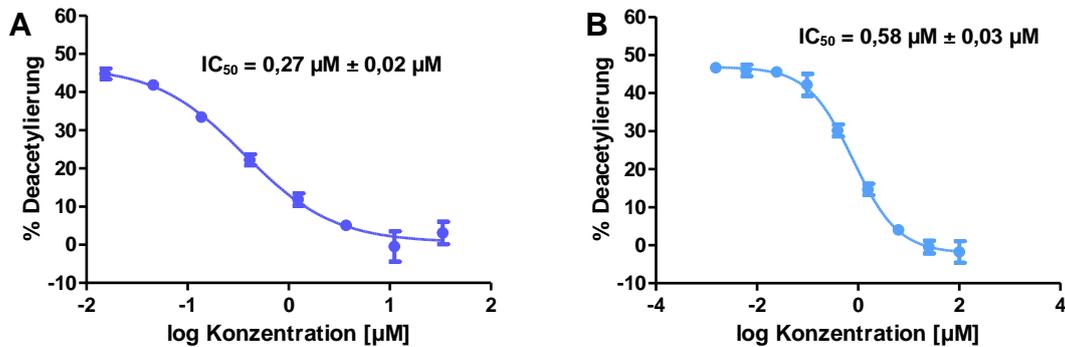
Aus diesen Resultaten wird ersichtlich, dass Pools aus bis zu 30 Substanzen problemlos in der MALDI-TOF MS-basierten Screeningmethode verwendet werden können, und die Methode folglich als Hochdurchsatz-Screeningverfahren geeignet ist.

#### 4.1.7 Bestimmung von $IC_{50}$ -/ $EC_{50}$ -Werten

Außerdem wurde getestet, ob die MALDI-TOF MS-basierte Methode für die Bestimmung von  $IC_{50}$ - bzw.  $EC_{50}$ -Werten, und somit auch für eine weitergehende Charakterisierung identifizierter Screeninghits, geeignet ist. Zu diesem Zweck wurden die  $IC_{50}$ - bzw.  $EC_{50}$ -Werte bereits bekannter SIRT1-Modulatoren anhand der optimierten MALDI-TOF MS-basierten Methode bestimmt und überprüft, ob die in der Literatur bereits vorhandenen Werte reproduziert werden können. Dieselben Proben wurden anschließend anhand einer auf ESI MS basierenden Detektionsmethode analysiert (BIOCIUS). Dies diente der Validierung der MALDI-TOF MS-basierten Detektionsmethode.

Um die  $IC_{50}$ -Wert-Bestimmung anhand des inhibitorischen Ansatzes der MALDI-TOF MS-basierten Methode zu überprüfen, wurden die beiden sehr potenten SIRT1-Inhibitoren Suramin und EX-527 verwendet. Sowohl für Suramin ( $IC_{50} =$

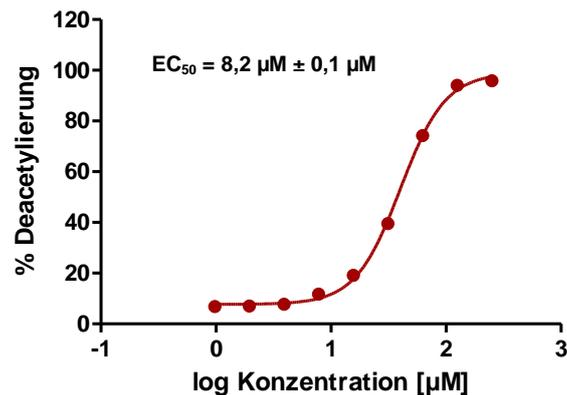
0,27  $\mu\text{M} \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) als auch für EX-527 ( $\text{IC}_{50} = 0,58 \mu\text{M} \pm 0,03 \mu\text{M}$ ) wurden  $\text{IC}_{50}$ -Werte derselben Größenordnung wie die Literaturwerte (107, 108) ermittelt. Durch ESI MS konnten die mittels MALDI-TOF MS bestimmten  $\text{IC}_{50}$ -Werte validiert werden. (Abbildung 4-16; Tabelle 4-1).



**Abbildung 4-16: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurven zur Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der SIRT1-Inhibitoren Suramin und EX-527**

Es wurde überprüft, ob die für den inhibitorischen Ansatz optimierte MALDI-TOF MS-basierte Methode zur  $\text{IC}_{50}$ -Wert-Bestimmung geeignet ist. Dafür wurde die SIRT1-Aktivität unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren A) Suramin und B) EX-527 bestimmt, indem die jeweilige prozentuale Deacetylierung des Histon H4-Substratpeptides detektiert wurde. (für Suramin:  $n = 8-12$ ; für EX-527:  $n = 4-12$ ;  $\text{MW} \pm \text{SD}$ )

Unter Anwendung des für die Ermittlung artifizierlicher Aktivatoren optimierten Reaktionsansatzes der MALDI-TOF MS-basierten Methode wurde für RSV ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $8,2 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$  detektiert. Auch in diesem Fall konnte somit der in der Literatur beschriebene Wert (155) reproduziert und der gemessene Wert anschließend mittels ESI MS validiert werden. (Abbildung 4-17; Tabelle 4-1).



**Abbildung 4-17: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurve zur Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes des artifiziellen SIRT1-Aktivators RSV**

Es wurde überprüft, ob die für die Ermittlung artifizieller Aktivatoren optimierte MALDI-TOF MS-basierte Methode zur EC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung geeignet ist. Dafür wurde die SIRT1-Aktivität unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des artifiziellen Aktivators RSV bestimmt, indem die jeweilige prozentuale Deacetylierung des AMC-Substratpeptides detektiert wurde. (n = 11-12; MW ± SD)

**Tabelle 4-1: Validierung der mittels MALDI-TOF MS detektierten IC<sub>50</sub>- bzw. EC<sub>50</sub>-Werte mit ESI MS und Vergleich mit Literaturwerten**

Substanz	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> -Werte [μM] (MALDI-TOF MS)	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> -Werte [μM] (ESI MS)	IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> -Werte [μM] (Literatur)
Suramin	0,27 ± 0,02 <sup>[1]</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>[1]</sup>	0,297 ± 0,01 <sup>[1]</sup> (108)
EX-527	0,58 ± 0,03 <sup>[1]</sup>	0,8 ± 0,7 <sup>[1]</sup>	0,098 bzw. 1,29 <sup>[1, 3]</sup> (107)
RSV	8,2 ± 0,1 <sup>[2]</sup>	8,0 ± 0,8 <sup>[2]</sup>	7 <sup>[2]</sup> (155)

[1] IC<sub>50</sub>-Wert

[2] EC<sub>50</sub>-Wert

[3] IC<sub>50</sub>-Wert abhängig von der Detektionsmethode

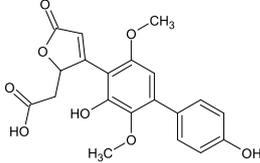
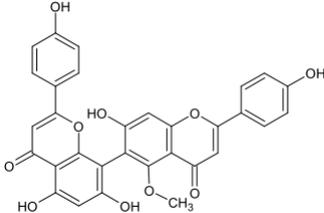
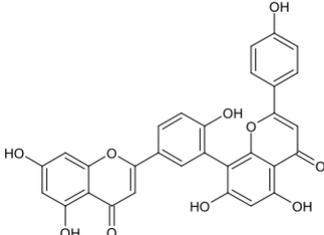
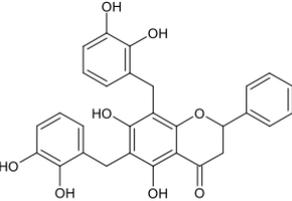
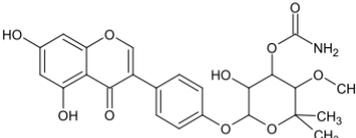
Diese Ergebnisse zeigen, dass die hier optimierte MALDI-TOF MS-basierte Detektionsmethode auch für die quantitative Charakterisierung von Screeninghits geeignet ist.

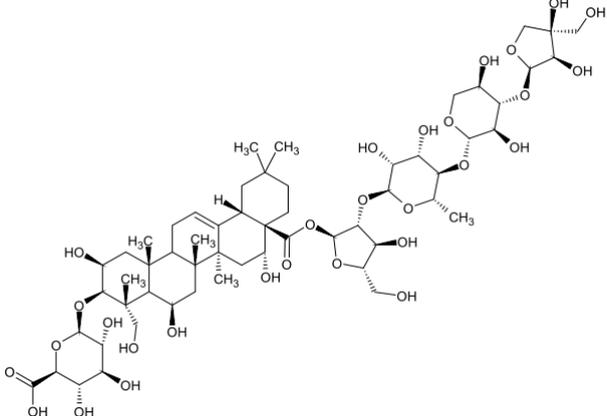
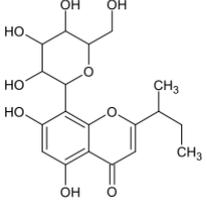
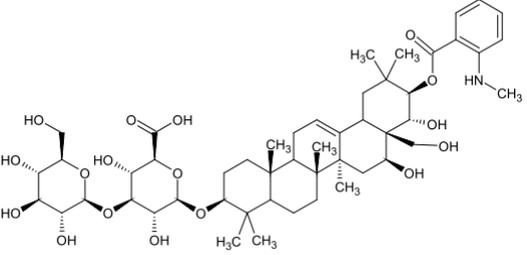
## 4.2 Screening von Naturstoffen auf SIRT1-Modulatoren

Um neue SIRT1-modulierende Substanzen zu finden, wurde mithilfe der MALDI-TOF MS-basierten Detektionsmethode ein Screening durchgeführt. Eine aus 5.500 Naturstoffen bestehende Substanzbibliothek wurde zu diesem Zweck sowohl auf SIRT1-Inhibitoren als auch auf artifizielle SIRT1-Aktivatoren untersucht.

Das Screening auf SIRT1-Inhibitoren hatte acht SIRT1-inhibierende Naturstoffe zum Ergebnis (Tabelle 4-2).

**Tabelle 4-2: Screeninghits für SIRT1-Inhibitoren**

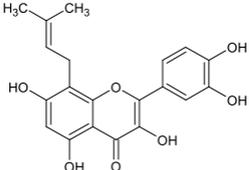
NP	Strukturen <sup>[1]</sup>	IC <sub>50</sub> [μM]
1		9,8 ± 0,7
2		28 ± 9
3		36 ± 6
4		46 ± 4
5		50 ± 3

6		---
7		---
8		---

[1] Die Strukturen wurden mit dem Programm ACD/ChemSketch Freeware, Version 12.01 (ACD/Labs) erstellt.

Das Screening auf artifizielle SIRT1-Aktivatoren resultierte in lediglich einem Naturstoff mit artifiziell aktivierender Wirkung auf SIRT1 (Tabelle 4-3).

**Tabelle 4-3: Screeninghit für artifizielle SIRT1-Aktivatoren**

NP	Struktur <sup>[1]</sup>	EC <sub>50</sub> [μM]
9		3,7 ± 0,1

[1] Die Struktur wurde mit dem Programm ACD/ChemSketch Freeware, Version 12.01 (ACD/Labs) erstellt.

### 4.3 Charakterisierung der SIRT1-Screeninghits

Im Anschluss an das MALDI-TOF MS-basierte Screeningverfahren wurden die ermittelten SIRT1-Screeninghits hinsichtlich diverser Parameter charakterisiert.

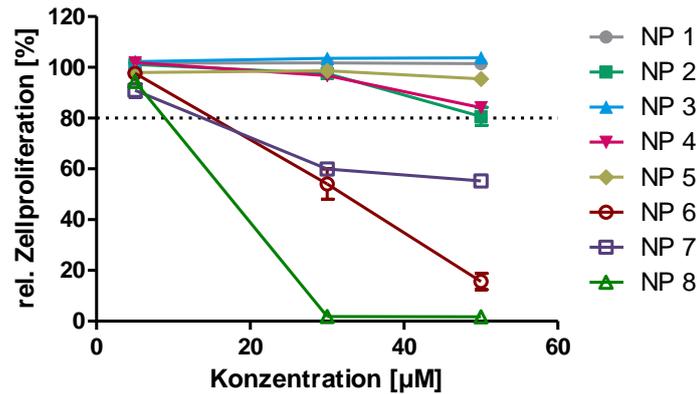
#### 4.3.1 Charakterisierung der SIRT1-Inhibitoren

Die im Screening ermittelten SIRT1-Inhibitoren wurden zunächst im Hinblick auf ihre cytotoxischen Eigenschaften untersucht. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der jeweiligen IC<sub>50</sub>-Werte der SIRT1-Inhibition anhand der MALDI-TOF MS-Methode für die nicht-toxischen Naturstoffe. Der Naturstoff mit der stärksten inhibitorischen Wirkung auf die SIRT1-Aktivität wurde schließlich im Zellsystem auf seine Effekte hinsichtlich der Acetylierung des Proteins p53 überprüft.

##### 4.3.1.1 Bestimmung der Cytotoxizität

Die Bestimmung der cytotoxischen Effekte der SIRT1-inhibierenden Screeninghits wurde in der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 durchgeführt. Die Zellen wurden für 22 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen inkubiert. Anschließend wurde die Zellproliferation durch Messung des zellulären ATP-Gehaltes luminometrisch ermittelt. Eine relative Zellproliferation von weniger als 80% wurde dabei als cytotoxisch definiert.

Fünf der SIRT1-Inhibitoren waren bis zu einer Konzentration von 50 µM nicht toxisch (NP 1-5). Drei der Naturstoffe übten hingegen bereits ab einer Konzentration von 30 µM einen toxischen Effekt auf die Zellen aus (NP 6-8) (Abbildung 4-18).

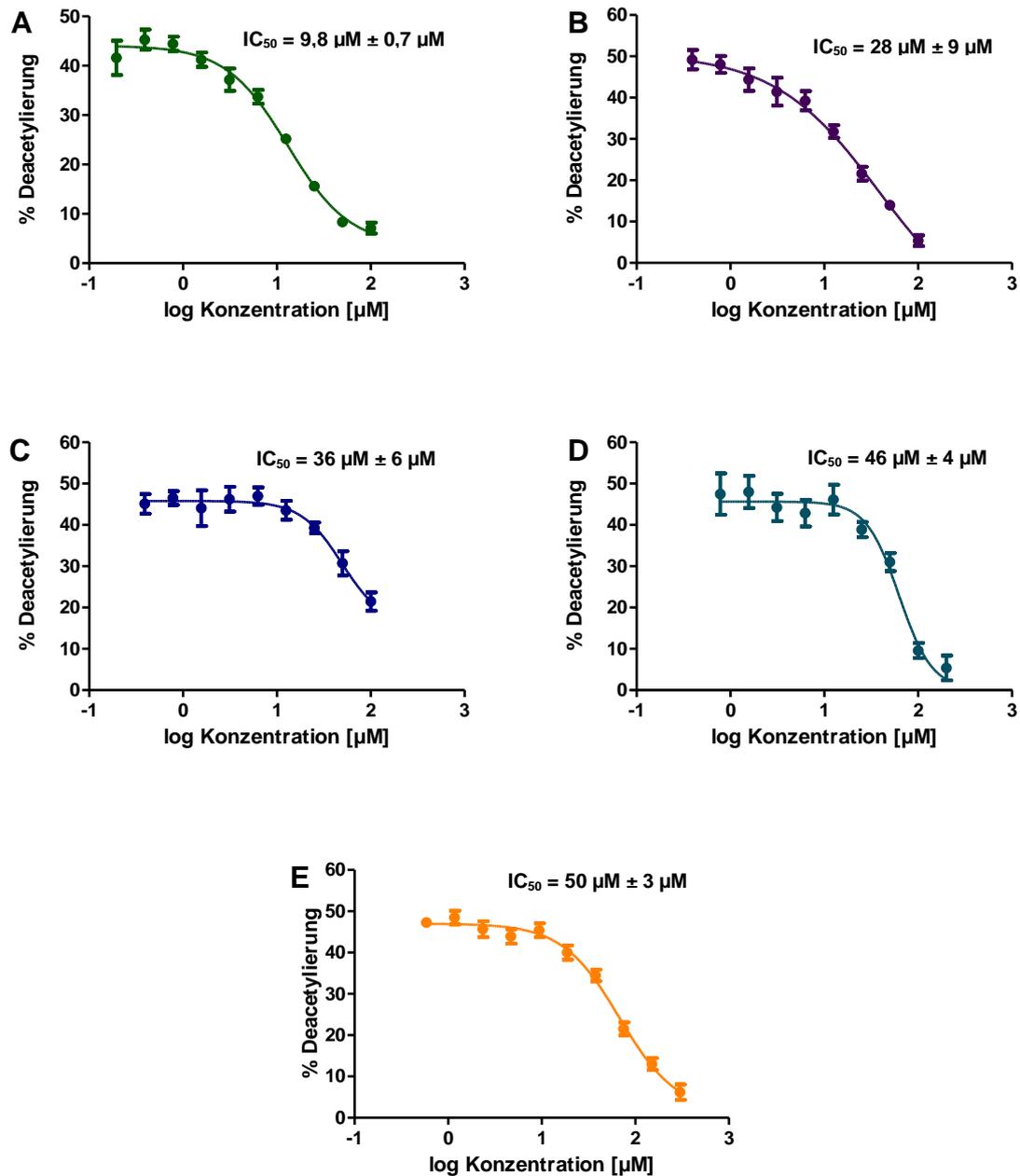


**Abbildung 4-18: Bestimmung der cytotoxischen Effekte der SIRT1-Inhibitoren NP 1-8 im HepG2-Zellmodell**

HepG2-Zellen wurden für 22 h mit verschiedenen Konzentrationen (5 µM, 30 µM, 50 µM) der acht im Screening identifizierten SIRT1-Inhibitoren behandelt. Durch Messung des zellulären ATP-Gehaltes wurde die Zellproliferation bestimmt. Eine relative Zellproliferation von weniger als 80% wurde als cytotoxisch definiert. Kontrollzellen wurden mit 0,05% DMSO behandelt. (n = 3; MW ± SEM)

#### 4.3.1.2 Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten

Die Naturstoffe NP 1-5, die sich im Zellsystem bis zu einer Konzentration von 50 µM als nicht toxisch erwiesen hatten, wurden anschließend weiter charakterisiert. Dafür wurden anhand des MALDI-TOF MS-basierten Detektionssystems die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen ermittelt. Die Inhibitoren wiesen IC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 9,8 µM bis 50 µM auf. Der mit 9,8 µM ± 0,7 µM stärkste SIRT1-Inhibitor war der Naturstoff NP1 (Abbildung 4-19, Tabelle 4-2).



**Abbildung 4-19: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurven zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der SIRT1-inhibierenden Screeninghits**

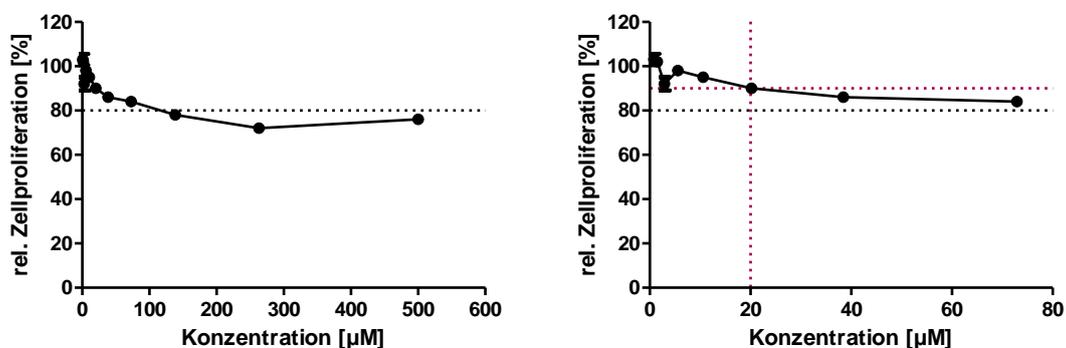
Für die fünf SIRT1-inhibierenden, nicht toxischen Screeninghits wurden anhand MALDI-TOF MS die  $IC_{50}$ -Werte bestimmt. Dafür wurde die SIRT1-Aktivität unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Inhibitoren NP 1-5 (A: NP1; B: NP2; C: NP3; D: NP4; E: NP5) bestimmt, indem die jeweilige prozentuale Deacetylierung des Substratpeptides ermittelt wurde. (für NP1:  $n = 4-12$ ; für NP2:  $n = 7-12$ ; für NP3:  $n = 12$ ; für NP4:  $n = 3-12$ ; für NP5:  $n = 8-12$ ;  $MW \pm SD$ )

#### 4.3.1.3 Quantifizierung der p53-Acetylierung mittels Western-Blot

Um den Einfluss einer SIRT1-modulierenden Substanz bezüglich der p53-Acetylierung im HepG2-Zellsystem untersuchen zu können, war eine Induktion dieser Acetylierung notwendig. (156) Die Acetylierung von p53 an der Aminosäure Lysin 382 wurde durch Auslösen von Stress durch das Cytostatikum Etoposid hervorgerufen. (157)

Aus diesem Grund wurde zunächst eine geeignete Etoposidkonzentration ermittelt, die keinen toxischen Effekt auf die HepG2-Zellen ausübt. Nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Etoposid über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde die Zellproliferation anhand des zellulären ATP-Gehaltes bestimmt.

Erst eine Etoposidkonzentration von über 100  $\mu\text{M}$  wirkte mit einer relativen Zellproliferation von unter 80% cytotoxisch auf die Zellen (Abbildung 4-20). Eine häufig in der Literatur verwendete Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Etoposid (156, 158-160) wurde daraufhin als geeignete Konzentration des Stressors gewählt.



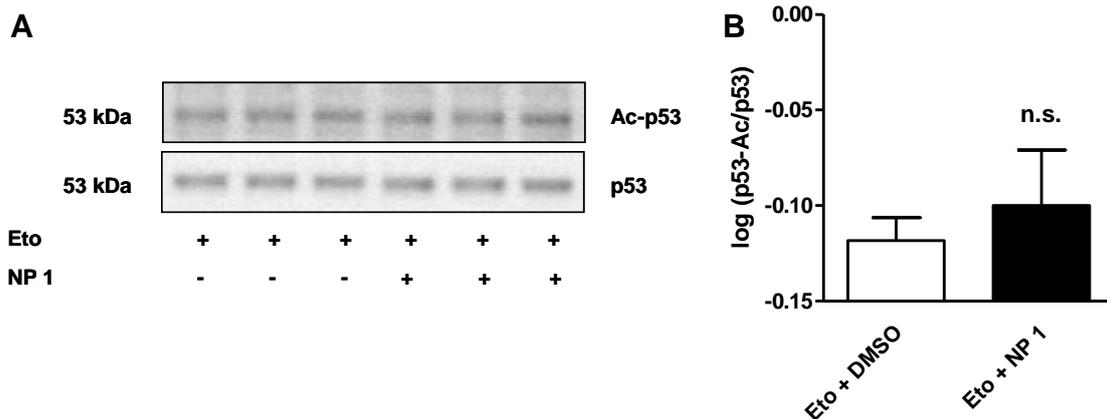
**Abbildung 4-20: Bestimmung der cytotoxischen Effekte des Cytostatikums Etoposid im HepG2-Zellmodell**

HepG2-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (0,8 – 500  $\mu\text{M}$ ) des Cytostatikums Etoposid behandelt. Durch Messung des zellulären ATP-Gehaltes wurde die Zellproliferation bestimmt. Eine relative Zellproliferation von weniger als 80% wurde als cytotoxisch definiert. Kontrollzellen wurden mit 0,5% DMSO behandelt. (n = 4; MW  $\pm$  SEM)

Nach Festlegung der Behandlungsbedingungen mit Etoposid wurde schließlich die Western-Blot Analyse durchgeführt. Dafür wurden die HepG2-Zellen mit

30  $\mu\text{M}$  NP1, dem stärksten SIRT1-Inhibitor, sowie mit 20  $\mu\text{M}$  Etoposid behandelt. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und in ihre nucleären und cytosolischen Fraktionen separiert.

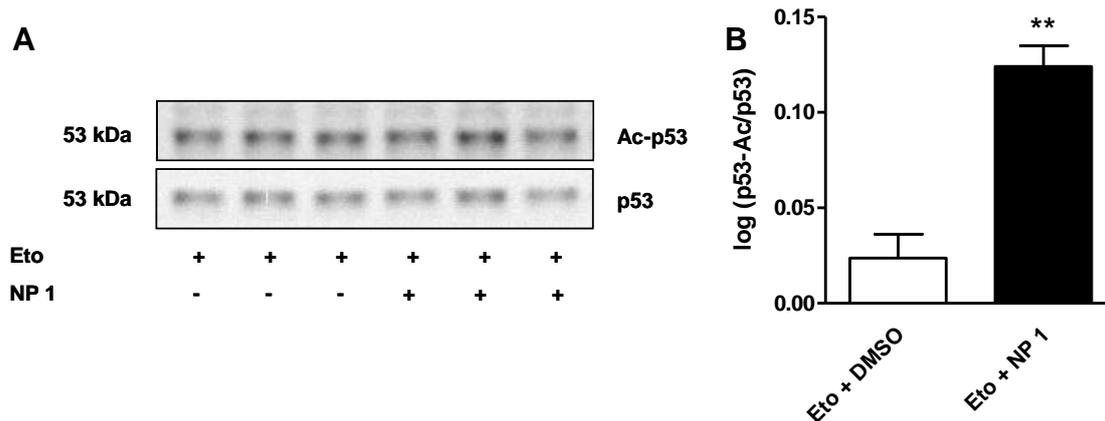
Die Western-Blot Analyse zeigte je nach Zellfraktion unterschiedliche Ergebnisse. So konnte im Cytosol durch eine Behandlung der Zellen mit NP1 keine signifikante Änderung im Acetylierungsstatus von p53 gemessen werden (Abbildung 4-21).



**Abbildung 4-21: Detektion der p53-Acetylierung in der cytosolischen Fraktion von HepG2-Zellen nach Behandlung mit NP1**

HepG2-Zellen wurden für 16 h mit 30  $\mu\text{M}$  NP1 sowie 20  $\mu\text{M}$  Etoposid (Eto) behandelt. Die p53-Acetylierung der cytosolischen Zellfraktion wurde mittels Western-Blot detektiert (A) und die Banden anschließend densitometrisch ausgewertet (B). Kontrollzellen wurden mit 0,2% DMSO + 20  $\mu\text{M}$  Etoposid behandelt. (n = 3; MW  $\pm$  SEM; n. s.: nicht signifikant)

Während die Behandlung mit NP1 keinen Effekt auf die cytosolische Zellfraktion hatte, konnte in der nucleären Fraktion der HepG2-Zellen eine signifikant erhöhte p53-Acetylierung detektiert werden (Abbildung 4-22).



**Abbildung 4-22: Detektion der p53-Acetylierung in der nucleären Fraktion von HepG2-Zellen nach Behandlung mit NP1**

HepG2-Zellen wurden für 16 h mit 30  $\mu$ M NP1 sowie 20  $\mu$ M Etoposid (Eto) behandelt. Die p53-Acetylierung der nucleären Zellfraktion wurde mittels Western-Blot detektiert (A) und die Banden anschließend densitometrisch ausgewertet (B). Kontrollzellen wurden mit 0,2% DMSO + 20  $\mu$ M Etoposid behandelt. (n = 3; MW  $\pm$  SEM; \*\*, p < 0,01 vs. DMSO)

Bei den Naturstoffen NP 1-5 handelt es sich somit um potente, nicht toxische SIRT1-Inhibitoren. Der stärkste SIRT1-Hemmstoff NP1 bewirkt zudem eine gesteigerte Acetylierung des SIRT1-Substrates p53 im Zellkern von HepG2-Zellen.

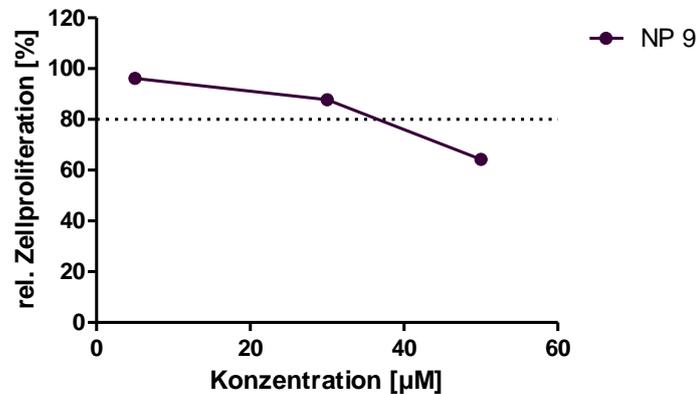
#### 4.3.2 Charakterisierung des artifiziellen SIRT1-Aktivators

Auch für den artifiziellen, SIRT1 aktivierenden Screeninghit NP9 wurden zunächst Messungen durchgeführt, die der Bestimmung der Cytotoxizität und des EC<sub>50</sub>-Wertes dienen. Weiterhin wurden Vergleiche mit RSV bezüglich ähnlicher Eigenschaften in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-haltigem Wasser angestellt. Zudem wurde der Einfluss von NP9 auf inflammatorische Signalwege im THP-1-Zellsystem überprüft.

##### 4.3.2.1 Bestimmung der Cytotoxizität

Neben den SIRT1-Inhibitorhits wurde auch der artifizielle SIRT1-Aktivatorhit bezüglich seiner cytotoxischen Effekte im HepG2-Zellsystem getestet. 22 Stunden nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an NP9 wurde die Zellproliferation durch Messung des zellulären ATP-Gehaltes bestimmt. Während sich eine Konzentration von 30  $\mu$ M NP9 nicht toxisch auf die Zellen

auswirkte, konnte bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  mit einer relativen Zellproliferation von 64% ein cytotoxischer Effekt beobachtet werden (Abbildung 4-23).

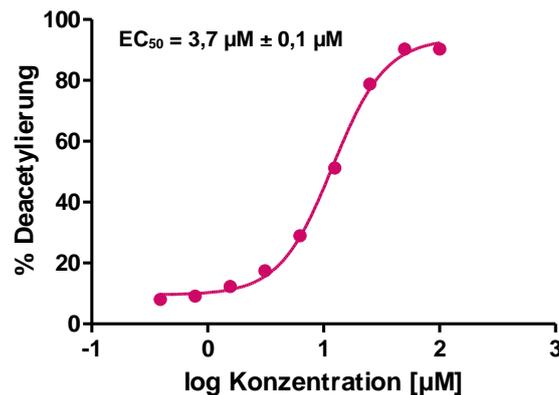


**Abbildung 4-23: Bestimmung der cytotoxischen Effekte des artifiziellen, SIRT1 aktivierenden Screeninghits NP9 im HepG2-Zellmodell**

HepG2-Zellen wurden für 22 h mit verschiedenen Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) des im Screening identifizierten artifiziellen SIRT1-Aktivators behandelt. Durch Messung des zellulären ATP-Gehaltes wurde die Zellproliferation bestimmt. Eine relative Zellproliferation von weniger als 80% wurde als cytotoxisch definiert. Kontrollzellen wurden mit 0,05% DMSO behandelt. (n = 3; MW  $\pm$  SEM)

#### 4.3.2.2 Bestimmung des $\text{EC}_{50}$ -Wertes

Weiterhin wurde der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von NP9 mittels MALDI-TOF MS-basierter Detektion bestimmt. Der artifizielle SIRT1-Aktivator weist mit einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von  $3,7 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$  (Abbildung 4-24; Tabelle 4-3) eine deutlich kleinere halbmaximale Effekorkonzentration auf als der ebenfalls anhand des AMC-Peptides ermittelte artifizielle SIRT1-Aktivator RSV ( $\text{EC}_{50} = 8,2 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$ ; Abbildung 4-17; Tabelle 4-1).



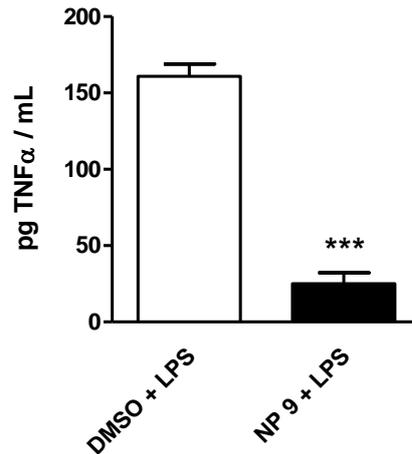
**Abbildung 4-24: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurve zur Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes des artifiziellen, SIRT1 aktivierenden Screeninghits NP9**

Für den artifiziellen, SIRT1 aktivierenden Screeninghit wurde anhand MALDI-TOF MS der EC<sub>50</sub>-Wert bestimmt. Dafür wurde die SIRT1-Aktivität unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des artifiziellen Aktivators NP9 bestimmt, indem die jeweilige prozentuale Deacetylierung des Substratpeptides ermittelt wurde. (n = 12; MW ± SD)

#### 4.3.2.3 Quantifizierung der TNFα-Sekretion mittels ELISA

SIRT1 deacetyliert den Transkriptionsfaktor NFκB und bewirkt dadurch eine Reprimierung seiner transkriptionellen Eigenschaften (22), die unter anderem die Expression von TNFα nach zellulärer LPS-Stimulierung umfassen. (152) In Übereinstimmung damit konnte in einer Studie gezeigt werden, dass eine durch LPS induzierte inflammatorische Reaktion in THP-1-Zellen durch die präventive Behandlung mit artifiziellen SIRT1-Aktivatoren reduziert werden konnte. Das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion wurde dabei anhand der TNFα-Freisetzung nachvollzogen. (153)

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der Effekt von NP9 auf die TNFα-Freisetzung im LPS-stimulierten THP-1-Zellsystem untersucht. Dabei konnte, wie auch bei (153), eine verminderte inflammatorische Reaktion der Zellen detektiert werden. NP9 in einer Konzentration von 10 μM reduzierte die LPS-induzierte TNFα-Sekretion der Zellen signifikant von 161 pg/mL auf 25 pg/mL (Abbildung 4-25).

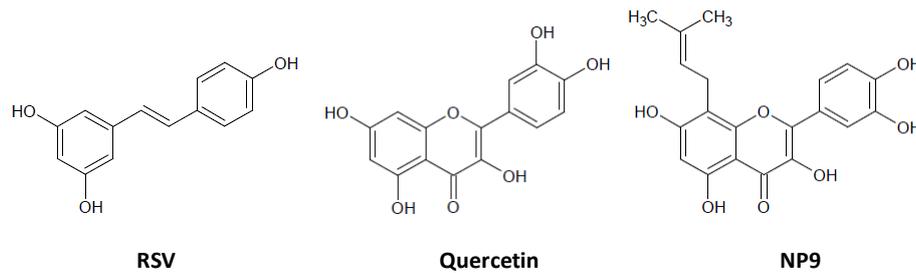


**Abbildung 4-25: Detektion des Einflusses von NP9 auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Sekretion durch THP-1-Zellen**

THP-1-Zellen wurden zuerst mit 10  $\mu$ M NP9 behandelt. Nach 1 h erfolgte die Induzierung der Inflammation durch Zugabe von 10 nM LPS. Nach weiteren 5 h Inkubation wurde der Überstand der Zellen geerntet und auf den Gehalt an TNF $\alpha$  untersucht. Die Detektion der TNF $\alpha$ -Freisetzung erfolgte mittels ELISA. Kontrollzellen wurden mit 0,2% DMSO + 10 nM LPS behandelt. (n = 3; MW  $\pm$  SEM; \*\*\*, p < 0,001 vs. DMSO + LPS)

#### 4.3.2.4 Eigenschaften in HCO $_3^-$ -haltigem ddH $_2$ O

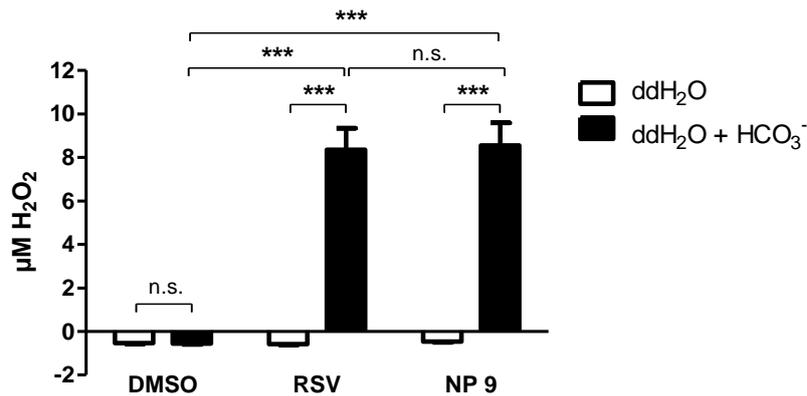
Die beiden artifiziellen SIRT1-Aktivatoren RSV und Quercetin (115) weisen eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu NP9 auf. Während Quercetin die Grundstruktur von NP9 darstellt, besitzt RSV, wie die beiden Substanzen, zwei Phenolringe mit mehreren Hydroxylgruppen (Abbildung 4-26). Da alle drei Substanzen unter Einsatz des AMC-Peptides als SIRT1-Aktivatoren detektiert wurden ist es möglich, dass ähnliche chemische Eigenschaften der Substanzen einen Hinweis auf den artifiziellen Aktivierungsmechanismus durch das AMC-markierte Peptid geben können.



**Abbildung 4-26: Chemische Strukturen der artifiziellen SIRT1-Aktivatoren RSV, Quercetin und NP9**

Die Arbeitsgruppe um Yang *et al.* beschreibt eine hohe Instabilität von RSV in  $\text{HCO}_3^-$ -haltigen Lösungen, wie z. B. Zellkulturmedien. Dabei konnten nach einer gewissen Inkubationszeit nur noch geringe Mengen des Stilbens nachgewiesen werden. Stattdessen wurde die Entwicklung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektiert. (161) Auch für den SIRT1-Aktivator Quercetin (115) wurde eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung nach Inkubation in Zellkulturmedien beschrieben (162).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion von RSV und NP9 nach der Inkubation beider Substanzen über einen Zeitraum von 17 h in  $\text{HCO}_3^-$ -haltigem Wasser überprüft. Während durch die Inkubation von RSV und NP9 in reinem  $\text{ddH}_2\text{O}$  keinerlei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung nachgewiesen werden konnte, bewirkte die Addition von  $\text{HCO}_3^-$  ebendiesen Effekt. Dabei bewirkten sowohl 50  $\mu\text{M}$  RSV als auch 50  $\mu\text{M}$  NP9 die Bildung annähernd gleicher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (8,4  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 8,6  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Abbildung 4-27).

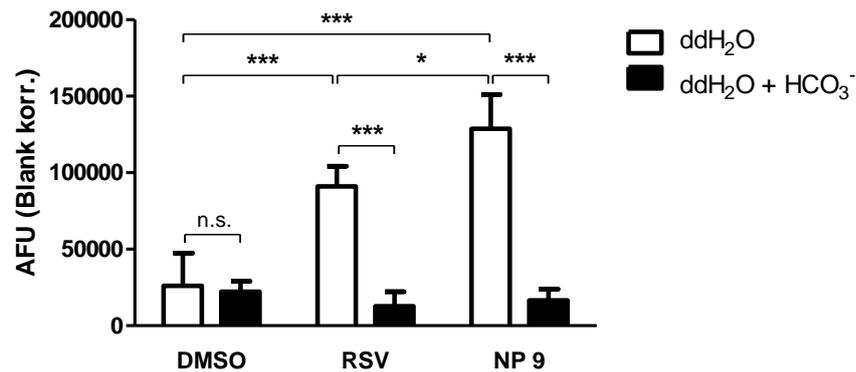


**Abbildung 4-27: Einfluss von  $\text{HCO}_3^-$  auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Generierung durch RSV und NP9**

Dargestellt ist die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Detektion nach Inkubation von RSV und NP9 in ddH<sub>2</sub>O bzw.  $\text{HCO}_3^-$ -haltigem ddH<sub>2</sub>O. Dafür wurden 50 µM RSV bzw. 50 µM NP9 in ddH<sub>2</sub>O bzw. ddH<sub>2</sub>O + 44,05 mM  $\text{HCO}_3^-$  über einen Zeitraum von 17 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion des generierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kontrollproben enthielten 0,2% DMSO. (n = 5; MW ± SD; \*\*\*, p < 0,001)

Weiterhin wurde die Integrität von RSV und NP9 nach einer Inkubationszeit von 18 h in ddH<sub>2</sub>O bzw. ddH<sub>2</sub>O +  $\text{HCO}_3^-$  anhand ihrer Fähigkeit überprüft, SIRT1-aktivierende Effekte mit der kommerziellen *FdL*-Methode (s. 1.2.4.2.2) hervorzurufen (Abbildung 4-28).

Das Ergebnis zeigt deutlich die artifizielle SIRT1-Aktivierung durch RSV und NP9 nach Inkubation der beiden Substanzen in ddH<sub>2</sub>O. Die Anwesenheit von  $\text{HCO}_3^-$  in der Inkubationslösung hatte zur Folge, dass keine SIRT1-Aktivierung mehr nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 4-28: Einfluss von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> auf die Integrität von RSV und NP9**

Dargestellt ist die anhand der *FdL*-Methode detektierte SIRT1-aktivierende Wirkung von RSV und NP9, die nach Inkubation der Substanzen in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-haltigem ddH<sub>2</sub>O nicht mehr vorhanden ist. Dafür wurden 50 µM RSV oder 50 µM NP9 in ddH<sub>2</sub>O bzw. ddH<sub>2</sub>O + 44,05 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> über einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Anschließend wurden die Substanzen in die SIRT1-Reaktion eingesetzt. Kontrollproben enthielten 0,2% DMSO. (n = 4; MW ± SD; ; \*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0,001)

Die Resultate zeigen somit, dass der artifizielle SIRT1-Aktivator NP9 einen stärkeren Aktivierungseffekt auf SIRT1 ausübt als RSV. NP9 ist in geringen Dosen bis 30 µM nicht toxisch und wirkt in THP-1-Zellen durch Verminderung der TNFα-Freisetzung antiinflammatorisch. Außerdem weist er in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-haltigem Wasser dieselben chemischen Eigenschaften wie RSV auf, was einen Hinweis auf den artifiziellen Aktivierungsmechanismus von SIRT1 geben könnte.

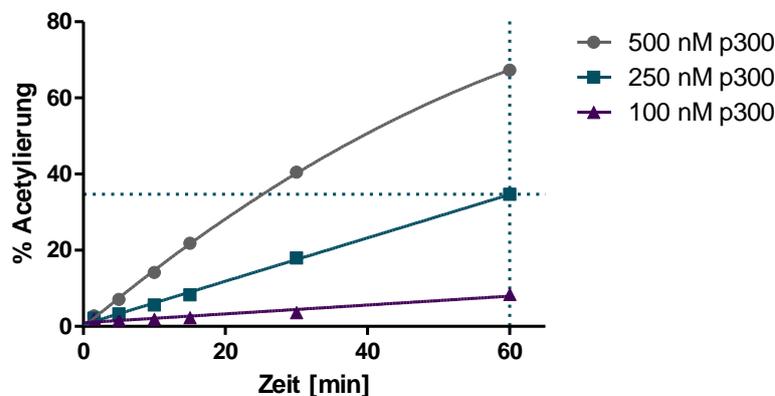
#### 4.4 Anwendbarkeit der MALDI-TOF MS-basierten Methode für p300

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte MALDI-TOF MS-basierte Methode wurde auch auf ihre Eignung hin überprüft, die Umkehrreaktion, also die Acetylierung eines Peptidsubstrates, zu detektieren.

Zu diesem Zweck wurde als Enzym die Histonacetyltransferase (HAT) p300 ausgewählt. Wie bereits für SIRT1, so wurden auch für p300 zunächst eine geeignete Enzymkonzentration sowie die optimale Reaktionszeit ermittelt. Weiterhin wurde die Generierung von IC<sub>50</sub>-Kurven im optimierten p300-Reaktionssystem getestet. Die Validierung erfolgte schließlich anhand einer auf Radioaktivität basierenden Methode.

#### 4.4.1 Bestimmung von Enzymkonzentration und Reaktionszeit

Um die geeigneten Reaktionsbedingungen für p300 zu ermitteln wurden unter Verwendung des HAT-Peptides drei verschiedene p300-Konzentrationen getestet und die Reaktionen zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Eine basale prozentuale Acetylierung von etwa 35% wurde als geeignet definiert, um sowohl eine mögliche Inhibierung (0% - 35% Acetylierung) als auch eine potentielle Aktivierung (35% - 100% Acetylierung) des Enzyms sichtbar machen zu können. Diese prozentuale Acetylierung wurde durch eine Reaktion von 250 nM p300 nach einer Reaktionszeit von 60 min bei 30 °C erreicht (Abbildung 4-29).



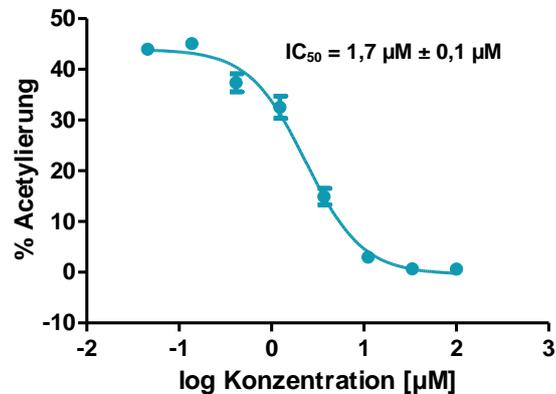
**Abbildung 4-29: Bestimmung von p300-Konzentration und Reaktionszeit für das HAT-Peptid**

Mittels MALDI-TOF MS wurden die optimale p300-Konzentration und Reaktionszeit für das HAT-Peptid bestimmt. Dafür wurde die prozentuale Acetylierung des HAT-Peptides nach Einsatz unterschiedlicher p300-Konzentrationen (500 nM, 250 nM, 100 nM) zu verschiedenen Zeitpunkten (0-60 min) bestimmt und gegen die jeweilige Reaktionszeit aufgetragen. Die Reaktionen enthielten 1% DMSO. (n = 11-12; MW ± SD)

#### 4.4.2 Bestimmung von $IC_{50}$ -Werten

Die MALDI-TOF MS-basierte Methode eignet sich auch zur genaueren Charakterisierung von p300-modulierenden Substanzen. Dies konnte anhand des neuen, artifiziellen SIRT1-Aktivators NP9 demonstriert werden. Aufgrund der im THP-1-Zellsystem beobachteten Effekte des artifiziellen SIRT1-Aktivators NP9 (Abbildung 4-25) wurde überprüft, ob auch eine Inhibierung der HAT p300 die Ursache dafür sein könnte. Dabei stellte sich heraus, dass NP9 ein potenter

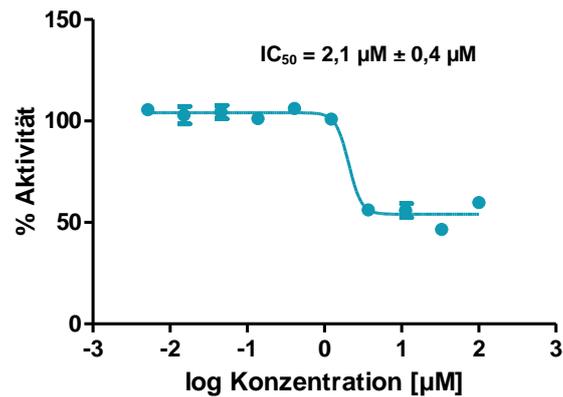
Inhibitor von p300 ist. Der  $IC_{50}$ -Wert von NP9 bezüglich p300 befindet sich bei einer Konzentration von  $1,7 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$  (Abbildung 4-30).



**Abbildung 4-30: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurve zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes des p300-Inhibitors NP9**

Für den p300-Inhibitor NP9 wurde anhand MALDI-TOF MS der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt. Dafür wurde die p300-Aktivität unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Inhibitors NP9 bestimmt, indem die jeweilige prozentuale Acetylierung des Substratpeptides detektiert wurde. ( $n = 10-12$ ;  $MW \pm SD$ )

Um die Validität des anhand der MALDI-TOF MS-basierten Methode detektierten  $IC_{50}$ -Wertes von NP9 auch durch eine MS-unabhängige Methode zu überprüfen, wurde der  $IC_{50}$ -Wert der Substanz zusätzlich mittels einer auf Radioaktivität basierenden Methode bestimmt (RBC). Trotz der abweichenden Reaktionsbedingungen konnte der  $IC_{50}$ -Wert mit  $2,1 \mu\text{M} \pm 0,4 \mu\text{M}$  sehr gut reproduziert werden (Abbildung 4-31).



**Abbildung 4-31: Mittels einer radioaktivitätsbasierten Methode generierte Kurve zur Validierung des IC<sub>50</sub>-Wertes des p300-Inhibitors NP9**

Für den p300-Inhibitor NP9 wurde anhand einer auf Radioaktivität basierenden Methode (RBC) der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt. Die prozentuale Aktivität bezieht sich auf die DMSO Kontrolle (100%). (n = 2; MW ± SD)

Anhand dieser Experimente wird erkennbar, dass die MALDI-TOF MS-basierte Methode auch für die Detektion der Umkehrreaktion, d. h. der Acetylierung von Peptidsubstraten, einsetzbar ist. Außerdem stellt p300 unter anderem bezüglich des Transkriptionsfaktors NFκB den enzymatischen Gegenspieler von SIRT1 dar. So kann sowohl eine Hemmung von p300 als auch eine potentielle Aktivierung von SIRT1 eine verminderte Acetylierung von NFκB nach sich ziehen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die antiinflammatorische Wirkung von NP9 im THP-1-Zellsystem sein.

## 5 Diskussion

### 5.1 MALDI-TOF MS-basierte Methodenentwicklung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf MALDI-TOF MS basierende SIRT1-Screeningmethode entwickelt, die den Vorteil der direkten Detektion einer physikalischen Eigenschaft von Substraten und/oder Produkten bietet. Auf diese Weise können nachteilige Effekte konventioneller optischer Methoden, wie die Generierung von Artefakten (s. 1.3.2), vermieden werden. Allerdings wird MALDI-TOF MS generell eine begrenzte Kapazität für die Quantifizierung von Proben zugeschrieben. Dies ist bedingt durch die häufig inhomogene Probenverteilung innerhalb des Probenkristalls sowie durch Ionensuppressionseffekte in komplexen Proben (s. 1.4.2.2).

Im Rahmen der Methodenentwicklung dieser Arbeit wurden zunächst grundlegende Aspekte der Probenquantifizierung optimiert. Anschließend konnten die Parameter der enzymatischen Reaktion überprüft und definiert werden.

#### 5.1.1 Peptidquantifizierung

Um mittels MALDI-TOF MS die bestmögliche Quantifizierung von Peptiden zu erzielen, sind eine homogene Präparation der Proben sowie die Wahl eines geeigneten Standards von Bedeutung (s. 1.4.2.2).

##### Einfluss der Probenpräparation auf die detektierten Peakverhältnisse

Um eine hohe Reproduzierbarkeit der generierten Probenspektren zu erreichen, wurde die „Ultra-Thin-Layer“- (UTL-) Präparationsmethode (148, 163) verwendet und optimiert. Grundlage dieser Präparation ist eine sehr dünne und gleichmäßig auf das Target aufgebrachte CHCA-Matrixschicht, die dem anschließend präparierten Proben-Matrix-Gemisch als Kristallisationsgrundlage dient. Um diesen Effekt optimal nutzen zu können ist es essentiell, dass das Proben-Matrix-Gemisch einen Lösungsmittelanteil von insgesamt weniger als 50% enthält, da andernfalls der UTL wieder aufgelöst wird. (148)

Bei der Optimierung der Probenpräparation wurde gezeigt, dass die detektierten Verhältnisse zweier Peptidpeaks am konsistentesten sind, wenn Probe und

Probenmatrix vor der Präparation vermischt werden, und das gesamte Proben-Matrix-Gemisch auf dem Target eintrocknet (Abbildung 4-2).

Die größten Unterschiede in den detektierten Peakverhältnissen waren hingegen zu sehen, wenn nach Bildung eines weißen Präzipitates zwischen der *UTL*-Matrix und der Probenmatrix das überschüssige Proben-Matrix-Gemisch abgesaugt wurde. Dieses Vorgehen wird in dem ursprünglichen Protokoll der *UTL*-Methode beschrieben. Das frühzeitige Absaugen ist dabei wichtig für eine exakte Massenbestimmung einer Probe, etwa bei der Identifizierung von Proteinen (163), da unterschiedlich hohe Probenkristalle auf dem Target Einfluss auf die Flugzeit im MS und folglich auf die Bestimmung der jeweiligen Proteine nehmen. In einer Anwendung wie der Screeningmethode, bei der Peptide bekannter Masse eingesetzt werden, ist eine sehr exakte Massenbestimmung jedoch von geringerer Bedeutung. Wichtig ist hierbei vor allem die bestmögliche Reproduzierbarkeit des Peakverhältnisses, welches jedoch durch den Absaugprozess verändert wird. Möglicherweise werden das acetylierte und das deacetylierte Peptid während des Kristallisationsprozesses unterschiedlich schnell in den Kristall eingebaut. Da insbesondere bei einer manuellen Präparation das Zeitintervall zwischen Präparation und Absaugen nie exakt gleich ist, werden auf diese Weise die Peptidverhältnisse beeinflusst, was die detektierten Abweichungen erklären könnte.

Auch das separate Auftragen der Probe vor der Probenmatrix, wobei von letzterer der Überschuss wiederum abgesaugt wurde, führte zu größeren Differenzen in den detektierten Peakverhältnissen. Somit scheint es für die Reproduzierbarkeit der Peakspektren von Vorteil zu sein, Probe und Matrix vor der Präparation in gelöstem Zustand zu mischen. Dieselbe Beobachtung machten Toh-Boyo *et al.*, allerdings mit einer alternativen Präparationsmethode. Bei einem Vergleich von separater und vorgemischter Auftragung von Probe und Matrix konnten durch letztere einheitlichere Ergebnisse erzielt werden. Dabei waren zudem die Resultate am besten reproduzierbar, wenn CHCA als Matrix verwendet wurde (164), dieselbe Matrix, die auch in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde. Neben der Art der Probenauftragung könnte allerdings auch hier das Absaugen der Probenmatrix zu der detektierten Inhomogenität der Probenpeaks beigetragen haben. Es ist denkbar, dass das Auftragen der Probenmatrix ein partielles

Auflösen der Probenmoleküle bewirkt. Auf diese Weise kann auch in diesem Fall wieder ein Teil der Proben mitabgesaugt und so das Ergebnis beeinflusst werden. Diese Untersuchung zeigt somit deutlich, dass es für die optimale Reproduzierbarkeit einer Messung entscheidend ist, die gesamte Probe auf dem Target trocknen zu lassen, da durch ein Absaugen überschüssiger Probe das Verhältnis der Probenbestandteile beeinflusst wird. Außerdem wirkt sich das Mischen von Probe und Probenmatrix positiv auf die Reproduzierbarkeit aus.

#### Einfluss des Reaktionspuffers auf die detektierten Peakverhältnisse

Auch der Einfluss von Reaktionspuffer und Stopplösung auf die detektierten Peakverhältnisse der Peptide wurde überprüft. Die Resultate zeigen einen deutlich negativen Einfluss der Ameisensäure auf die Detektierbarkeit des deacetylierten Peptides, aber auch die weiteren Bestandteile der Deacetylierungsreaktion scheinen sich nachteilig darauf auszuwirken (Abbildung 4-3).

Der Einfluss durch die in der Stopplösung enthaltene Ameisensäure lässt zunächst vermuten, dass es sich bei dieser Beobachtung um einen Ionisierungseffekt handelt, d. h. dass das acetylierte Peptid im MALDI-Prozess besser ionisiert werden kann als das deacetylierte Peptid. Betrachtet man allerdings die chemischen Strukturen der Peptide, so sieht man, dass genau das Gegenteil der Fall sein müsste, da die  $\epsilon$ -Aminogruppe der deacetylierten Lysinseitenkette ( $R-NH_2$ ) sehr gut protoniert werden kann ( $R-NH_3^+$ ), während dies bei der acetylierten  $\epsilon$ -Aminogruppe ( $R-NH-COCH_3$ ) nicht so einfach möglich ist.

Die verringerte Detektion des deacetylierten Peptides scheint seine Ursache vielmehr in der Peptidaufreinigung zu haben. Die Säulen der Oasis HLB  $\mu$ Elutionsplatte (Waters) werden mit 0,1% TFA äquilibriert, sodass das Sorptionsmittel vermutlich positiv geladen wird. Liegt das deacetylierte Peptid durch Zusatz von Ameisensäure in einem sauren Milieu vor, so besitzt es durch die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenkette eine zusätzliche positive Ladung im Vergleich zum acetylierten Peptid. Da die positiven Ladungen von Sorptionsmittel und deacetyliertem Peptid eine Bindung erschweren, ist dies wahrscheinlich die Erklärung für die generell bessere Detektierbarkeit der aufgereinigten acetylierten Peptide in der vorliegenden Methode.

Im Aufreinigungsschritt könnte zudem die Ursache für die generell etwas geringere Detektierbarkeit des Histon H4-Peptides im Vergleich zum AMC-Peptid

liegen. Die Sequenz des Histon H4-Peptides beinhaltet mehr basische Aminosäuren, die im sauren Milieu eine positive Ladung aufweisen, als das AMC-Peptid. Dies führt vermutlich zu einem gewissen Verlust an Histon H4-Peptid und folglich zu dem genannten Effekt.

Auch der Einfluss der übrigen Reaktionskomponenten auf die Detektierbarkeit des deacetylierten Peptides könnte mit dem Aufreinigungsschritt in Verbindung stehen, indem diese selbst an das Sorptionsmittel binden und auf diese Weise Bindungsstellen blockiert werden.

#### Quantifizierung anhand eines internen Standards

Da in der MALDI-TOF MS die Peakintensitäten zwischen einzelnen Messungen sehr stark schwanken können, ist in jedem Spektrum das Vorhandensein eines Referenzpeaks notwendig, zu dem der relevante Peak jeweils ins Verhältnis gesetzt werden kann (s. 1.4.2.2). Dieser Referenzpeak wird häufig durch einen internen Standard erzeugt, der dem Analyten idealerweise chemisch und physikalisch sehr ähnlich ist. Auf diese Weise sind die Ionisierungseigenschaften von Analyt und internem Standard sehr gut vergleichbar, was wiederum eine gute Quantifizierung des Analyten ermöglicht. (145) Ein Beispiel für solche internen Standards sind die sogenannten AQUA- (**A**bsolute **Q**uantifizierung) Peptide. Diese synthetischen Peptide besitzen dieselbe Sequenz wie die zu quantifizierenden Peptide, beinhalten jedoch stabile Isotope. Der dadurch vorhandene Massenunterschied ermöglicht die absolute Quantifizierung der ansonsten identischen Peptide. (165) Eine weitere Methode ist die Dimethylmarkierung, die eine Quantifizierung von Peptiden anhand einer nachträglichen Markierung mit stabilen Isotopen ermöglicht. (166)

Eine Quantifizierung von Proben, die Peptide mit und ohne eine bestimmte posttranslationale Modifikation beinhalten, ist vergleichsweise einfach, da die Proben mit dem jeweils anderen Peptid im un-/modifizierten Zustand bereits einen internen Standard beinhalten. Matsumoto *et al.* beschreiben eine gute Reproduzierbarkeit der Peakverhältnisse von phosphorylierten und dephosphorylierten Peptiden mittels MALDI-TOF MS. (167) Anhand der Peakverhältnisse kann somit ohne Zusatz eines internen Standards die relative Quantifizierung der Analyten erfolgen. Ist eine absolute Quantifizierung

erforderlich, so kann eine externe Kalibrationskurve erstellt werden, wie Tost *et al.* am Beispiel der CpG-Methylierung zeigen. (168)

Diese Methoden der relativen sowie der absoluten Quantifizierung wurden auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die absolute Quantifizierung war dabei für die enzymkinetischen Fragestellungen und für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -/ $EC_{50}$ -Werte von Bedeutung, da in diesen Fällen die absoluten Werte entscheidend für das Endergebnis sind. In den Screening-assoziierten Versuchen wurde die relative Quantifizierung angewandt, da so einerseits mehr Proben auf das Target aufgetragen werden können, und andererseits auch anhand relativer Zahlen eine Identifizierung von Screeninghits möglich ist.

Die im Rahmen der absoluten Quantifizierung generierten Kalibrationskurven für die getesteten Peptide zeigten eine überwiegend bessere Detektierbarkeit des jeweils acetylierten Peptides, was vermutlich mit der Peptidaufreinigung in Zusammenhang steht (s. o.). Daraus wird ersichtlich, dass die Proben für die Erstellung einer Kalibrationskurve, abgesehen von der enzymatischen Reaktion, unter möglichst identischen Bedingungen wie die Reaktionsproben behandelt werden müssen. Auf diese Weise können sich alle Faktoren, die das Peptidverhältnis der Reaktionsproben beeinflussen, auch auf die Proben der Kalibrationskurve auswirken – und die Quantifizierung ist so exakt wie möglich.

### **5.1.2 Art des Peptidsubstrates**

Bei dem Test auf den Einfluss verschiedener Peptidsubstrate auf die Aktivierbarkeit von SIRT1 durch RSV und SRT1720 wurde festgestellt, dass das Ergebnis von der Art des eingesetzten Peptides abhängig ist. Eine SIRT1-Aktivierung konnte dabei nur festgestellt werden, wenn das Peptid eine Fluoreszenzmarkierung aufwies (s. 4.1.3).

Eine aktuelle Studie von Gertz *et al.* liefert hierfür einen Erklärungsansatz. Anhand von Kristallkomplexen aus SIRT5, AMC-Peptid und RSV sowie aus SIRT3, AMC-Peptid und Piceatannol wurde der enzymatische Reaktionsmechanismus hergeleitet. Demnach führt die Bindung des Peptidsubstrates an das Sirtuin dazu, dass die Substanz sowohl eine Interaktion mit dem Sirtuin, als auch mit dem C-Terminus des Peptides eingehen kann. Auf diese Weise wird der Eingang zur Substratbindungsstelle verschlossen und das Peptid in eine Position gebracht, die eine Deacetylierung entweder begünstigt (Aktivierung) oder verhindert

(Inhibierung). Ob es sich bei dem durch einen SIRT1-Modulator ausgelösten Effekt um eine Aktivierung oder um eine Inhibierung handelt hängt somit scheinbar davon ab, welche Struktur das Peptid C-terminal der Acetylgruppe aufweist, und inwiefern eine daran bindende Substanz die Position des Peptides zum Sirtuin beeinflusst. (169)

Gertz *et al.* diskutieren weiterhin, dass der vorhandene Fluorophor des AMC-Peptides in derjenigen Tasche des Sirtuins gebunden ist, in der normalerweise die Aminosäuren von Peptidsubstraten liegen, die sich C-terminal der jeweiligen Acetylgruppe befinden. Demnach ermöglicht der Fluorophor die Bindung eines Aktivators an das Peptid, was bei Peptiden ohne eine C-terminale Aminosäure nicht möglich ist. Weiterhin ist bei längeren Peptiden jedoch auch die Art der C-terminalen Aminosäuren von entscheidender Bedeutung für die Wirkung einer Substanz. So konnten Gertz *et al.* eine Aktivierung von SIRT5 durch RSV unter Verwendung einer unmarkierten Peptidsequenz des Proteins Peroxiredoxin 1 messen, allerdings nicht unter Einsatz des C-terminal verlängerten und dafür unmarkierten AMC-Peptides, welches auf dem Protein p53 basiert. (169)

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. So war bei den Peptiden, mit denen eine SIRT1-Aktivierung zu sehen war (AMC-, TAMRA-Peptid), der Fluorophor C-terminal lokalisiert, bei den Peptiden ohne Aktivierungseffekt war hingegen entweder kein Fluorophor vorhanden (p53-, Non-TAMRA-Peptid) oder er befand sich am N-Terminus des Peptides (Fluorescein-Peptid). Die hierbei sichtbare Hemmung von SIRT1 könnte durch eine nachteilige Positionierung des Peptides nach Bindung der artifiziellen Aktivatoren erklärt werden, wie in (169) beschrieben wird. Weiterhin stimmt die Präferenz von RSV bezüglich des AMC-Peptides sowie von SRT1720 bezüglich des TAMRA-Peptides mit dem Ergebnis überein, dass zwischen der jeweiligen Substanz und dem Peptid eine Interaktion stattfindet (169).

Die Ergebnisse von Gertz *et al.* machen deutlich, dass es tatsächlich Sirtuin-aktivierende Substanzen geben kann, allerdings nur für bestimmte Substrate. (169) Dementsprechend konnten Studien, die eine mögliche SIRT1-Aktivierung durch RSV und/oder die SRT-Substanzen anhand der Proteinsubstrate PGC-1 $\alpha$  und p53 untersuchten, keinerlei Aktivierung feststellen. (120, 121) Wurde das Protein Acetyl-CoA-Synthetase 1 als Substrat verwendet, konnte jedoch eine schwache Aktivierung detektiert werden. (120) Es ist somit notwendig, die für eine

Aktivierung geeigneten SIRT1-Substrate anhand ihrer C-terminalen Aminosäuresequenzen zunächst zu identifizieren, um anschließend erwägen zu können, ob eine gesteigerte Deacetylierung dieser Substrate mit einem gesundheitlichen Nutzen einhergehen würde. In einem solchen Fall könnten anschließend Screenings auf solche, SIRT1 substratspezifisch aktivierenden Substanzen durchgeführt werden. Auf diese Weise könnten verschiedene Stoffwechselwege, die durch die Aktivität von SIRT1 positiv oder negativ reguliert werden, auf unterschiedliche Weise gesteuert werden. Ist eine gesteigerte Aktivität von SIRT1 beispielsweise wichtig für eine Verminderung von Entzündungsantworten (56), so kann sie sich negativ auf die Entwicklung von Ängsten und Depressionen auswirken. (60) Ein NFκB-spezifischer SIRT1-Aktivator könnte folglich eine reduzierte Inflammation zur Folge haben, ohne die Gefahr einer Depression mit sich zu bringen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die bislang anhand fluoreszenzmarkierter Peptide identifizierten artifiziellen SIRT1-Aktivatoren auch unter Verwendung bestimmter natürlicher Substrate SIRT1-aktivierende Eigenschaften aufweisen. Dadurch könnten eventuell auch die zellulären Effekte dieser Substanzen erklärt werden.

Um durch das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Screening SIRT1-Inhibitoren und mögliche Aktivatoren identifizieren zu können, wurde das Screening sowohl mit einem C-terminal fluoreszenzmarkierten als auch mit einem natürlichen Peptid durchgeführt. Dies ermöglichte einerseits die genauere Betrachtung der Eigenschaften von artifiziellen Aktivatoren und andererseits die artefaktfreie Ermittlung von Inhibitoren mit anschließender Charakterisierung.

### ***5.1.3 Optimierung der Reaktionsparameter***

Für die bestmögliche Detektierbarkeit enzymatischer Modulatoren wurden verschiedene Reaktionsparameter optimiert.

#### ***Konzentration des Peptidsubstrates***

Enzymatische Inhibitoren werden aufgrund ihrer Wirkungsweisen in unterschiedliche Gruppen unterteilt. Die Hauptgruppen umfassen die kompetitiven Inhibitoren, die mit dem Substrat um die Bindungsstelle am Enzym konkurrieren, die nichtkompetitiven Inhibitoren, die das Enzym an einer anderen Stelle als das

Substrat binden, und die unkompetitiven Inhibitoren, die nur an den Enzym-Substrat-Komplex binden. Ein Inhibitor-Screening kann für die Detektion kompetitiver Inhibitoren optimiert werden, indem die Substratkonzentration minimiert wird. Für die Ermittlung unkompetitiver Inhibitoren ist es hingegen von Vorteil, eine möglichst hohe Substratkonzentration einzusetzen, während nichtkompetitive Inhibitoren davon unabhängig sind. Zur Orientierung, ob es sich bei einer Substratkonzentration um einen eher hohen oder geringen Wert handelt, wird häufig der  $K_m$ -Wert des eingesetzten Substrates betrachtet. (151) Der  $K_m$ -Wert steht mit der Dissoziationskonstanten  $K_d$  in Zusammenhang und lässt somit Rückschlüsse auf die Substrataffinität zu. (154) Deshalb sollte für die Ermittlung kompetitiver Inhibitoren die Substratkonzentration unterhalb, für die Bestimmung unkompetitiver Inhibitoren über dem  $K_m$ -Wert des Substrates liegen. Die Ermittlung nichtkompetitiver Inhibitoren kann auf diese Weise nicht optimiert werden. Da in den meisten Fällen das Interesse in der Detektion kompetitiver Inhibitoren liegt (151), wurde die Substratkonzentration des Histon H4-Peptides so weit unter dessen  $K_m$ -Wert festgesetzt, dass noch eine gute Detektierbarkeit mit MALDI-TOF MS gewährleistet ist. Vorteilhaft ist hierbei einerseits, dass auch die nichtkompetitiven Inhibitoren mit erfasst werden, sowie dass andererseits der Substratverbrauch sehr gering gehalten werden kann, was zu einer Minimierung der Screeningkosten beiträgt.

Auch bei der Wahl der Substratkonzentration für das artifizielle Aktivator-Screening wurde der  $K_m$ -Wert des AMC-Peptides zugrunde gelegt. Für die SRT-Substanzen und RSV wurde festgestellt, dass die scheinbare Aktivierung von SIRT1 darauf beruht, dass der  $K_m$ -Wert des Peptidsubstrates zu SIRT1 durch Zugabe der Substanzen verringert wird. (115, 116) Dies bedeutet, dass das Enzym unter Vorhandensein dieser Aktivatoren bereits bei geringeren Substratkonzentrationen die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht, als ohne die Aktivatoren. Das resultiert in einer erhöhten Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms durch Zugabe der Aktivatoren. Je kleiner die Substratkonzentration in einem Screeningansatz gewählt wird, desto sensibler ist die Methode auch für die Detektion schwächerer Aktivatoren, da das Enzym in diesem Bereich noch wenig gesättigt ist und eine Umsatzsteigerung somit sehr deutlich erkennbar wird. Aufgrund dessen wurde auch für den artifiziellen Aktivator-Screeningansatz die Konzentration des Peptidsubstrates sehr gering gewählt.

### SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit

Für die Ermittlung von SIRT1-Inhibitoren wurde eine basale prozentuale Deacetylierung des Peptidsubstrates von etwa 40% gewählt. Dadurch wird ein optimales Detektionsfenster (0% - 40% Deacetylierung) zugrunde gelegt (Abbildung 4-10). Dieses Fenster ist ausreichend groß, um unterschiedliche Deacetylierungsstufen des acetylierten Peptidsubstrates mittels MALDI-TOF MS optimal detektieren zu können. Es wurde darauf verzichtet das Detektionsfenster größer zu wählen, da sich mit steigendem basalem Substratumsatz Faktoren wie Substratdepletion und Produkthemmung negativ auf die Screeninghit-Rate oder die Höhe der generierten  $IC_{50}$ -Werte auswirken können. (151) Um eine Deacetylierung des Peptidsubstrates um 40% zu erreichen, wurde bezüglich der Faktoren SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit ein Kompromiss gewählt, sodass weder zu viel Zeit (30 min), noch zu große Mengen an SIRT1 (10 nM) investiert werden müssen.

Bei der Wahl einer geeigneten SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für den artifiziellen Aktivator-Screeningansatz wurden 50 nM SIRT1 eingesetzt, um innerhalb einer Reaktionszeit von 30 min einen Substratumsatz von annähernd 10% zu erzielen. Dieser basale Substratumsatz wurde als Ausgangspunkt für die Detektion artifizieller SIRT1-Aktivatoren gewählt, da auf diese Weise ein großes Detektionsfenster (10% - 100% Deacetylierung) zur Verfügung steht. In diesem Fall war es schwierig, das Detektionsfenster nach oben hin zu begrenzen und damit die nachteiligen Effekte von Substratdepletion und Produkthemmung zu minimieren, da bei enzymbasierten Screenings auf Aktivatoren stets die Möglichkeit besteht, dass eine Substanz ermittelt wird, die eine stärkere Aktivierungswirkung auf das Enzym ausübt als der bis dahin bekannte stärkste Aktivator. Aus diesem Grund wurde lediglich darauf geachtet, die basale Deacetylierung bei einem geringen Wert anzusetzen.

#### **5.1.4 Anwendungsgebiete der Methode**

Die MALDI-TOF MS-basierte Methode wurde sowohl auf ihre Anwendbarkeit als Screeningmethode überprüft als auch auf ihre Geeignetheit für die Charakterisierung von Screeninghits.

### Screeningmethode

Um die Qualität der optimierten Screeningansätze zu überprüfen, wurde sowohl für den Inhibitor-, als auch für den artifiziellen Aktivatoransatz der sogenannte Z'-Faktor (149) generiert. Der Z'-Faktor ist ein einfacher, statistischer Parameter, anhand welchem die Robustheit einer Screeningmethode bestimmt werden kann. Um ihn zu bestimmen, werden die Mittelwerte und die dreifachen Standardabweichungen mehrfacher Messungen einer Positiv- und einer Negativkontrolle in Betracht gezogen (s. 3.2.1.7, (149)). Der Bereich zwischen den inneren Standardabweichungsgrenzen der beiden Kontrollen definiert das Trennungsband zwischen den beiden Kontrollsubstanzen (Abbildung 4-12, Abbildung 4-13). Je breiter dieses Trennungsband ist, desto besser können Screeninghits identifiziert werden, die sich im Normalfall zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle befinden. (149)

Als Kontrollsubstanzen im Inhibitor-Screeningansatz wurden 40  $\mu\text{M}$  Suramin und 1% DMSO verwendet. Da Suramin einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 297 nM aufweist (108), wurde auf diese Weise eine starke Hemmung von SIRT1 erreicht. Somit ist Suramin eine gute Positivkontrolle für die Bestimmung des Z'-Faktors. Dieser lag mit den optimierten Versuchsbedingungen bei einem Wert von 0,5. Somit handelt es sich um eine sehr robuste Screeningmethode ( $1 < Z' \leq 0,5$ ) mit einem großen Trennungsband. (149)

Für die Z'-Faktor-Bestimmung des artifiziellen Aktivator-Screeningansatzes wurden 40  $\mu\text{M}$  RSV und 1% DMSO als Kontrollsubstanzen eingesetzt. Da RSV den bislang stärksten, anhand des AMC-Peptides detektierten SIRT1-Aktivator darstellte (115), wurde diese Substanz als Positivkontrolle herangezogen. Der so unter den optimierten Versuchsbedingungen generierte Z'-Faktor betrug 0,7. Somit handelt es sich auch in diesem Fall um eine sehr robuste MALDI-TOF MS-basierte Screeningmethode. (149) Da es durchaus noch stärker aktivierende Substanzen als RSV geben kann, wurde der Z'-Faktor mehr als ein Robustheitsmaß für die Methode generiert, und weniger zur Definierung des Trennungsbandes, da die RSV-Kontrolle möglicherweise nicht die höchstmögliche Positivkontrolle ist. Da durch den Einsatz von 40  $\mu\text{M}$  RSV unter den gegebenen Bedingungen eine Deacetylierung von etwa 40% erreicht wurde, besteht die

Möglichkeit anhand dieser Methode noch weitaus stärkere SIRT1-Aktivatoren als RSV zu ermitteln.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Screeningansätze dazu geeignet sind, um aus Substanzpools verschiedener Größe SIRT1-Modulatoren zu detektieren (s. 4.1.6). Problematisch könnte dabei sein, dass mit der Größe der Pools auch die Anzahl der vorhandenen Moleküle pro Reaktionsansatz ansteigt, was eine unspezifische Hemmung des Enzyms zur Folge haben könnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die SIRT1-Hemmung durch Suramin bzw. die artifizielle SIRT1-Aktivierung durch RSV auch aus Pools von bis zu 30 Substanzen heraus detektiert werden kann (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15).

Da durch die Verwendung von Substanzpools sowohl Zeit als auch Kosten eingespart werden können, kann die entwickelte MALDI-TOF MS-basierte Methode als Hochdurchsatz-Screeningmethode eingesetzt werden. Obwohl die Massenspektrometrie den großen Vorteil aufweist, ein Screening mit natürlichen Peptiden zu ermöglichen, so ist sie doch mit einem höheren Zeitaufwand im Vergleich zu fluoreszenzbasierten Methoden verbunden. Allerdings stellt die häufig auftretende Autofluoreszenz von Substanzen in Screeningbibliotheken für fluoreszenzbasierte Methoden ein großes Problem dar. Bei einem Einsatz von Substanzpools im Rahmen fluoreszenzbasierter Methoden müsste somit das Risiko zahlreicher falsch-positiver Screeninghits in Kauf genommen werden. Da dieses Risiko bei der MALDI-TOF MS-basierten Methode nicht besteht, stellt der Einsatz von Pools (s. 3.2.1.1) eine Möglichkeit dar, den höheren Zeitaufwand wieder auszugleichen.

### Charakterisierung von Substanzen

Idealerweise werden enzymkinetische Messungen innerhalb des Bereiches der Anfangsgeschwindigkeit eines Enzyms durchgeführt, was einem Substratumsatz von weniger als 10% entspricht. Nur in diesem Bereich weist die Substratumsatzkurve einen linearen Verlauf auf, während sie im weiteren Reaktionsverlauf aufgrund von Substratdepletion und möglicher Produkthemmung zunehmend abflacht. Wird die Bestimmung von  $IC_{50}$ - oder  $EC_{50}$ -Werten nicht im linearen Anfangsbereich der Substratumsatzkurve durchgeführt, hat dies Auswirkungen auf die Größe der detektierten Werte. Die Ursache dafür ist, dass

durch das Abflachen der Substratumsatzkurven die gemessenen Effekte kleiner ausfallen als die Effekte tatsächlich sind. (151)

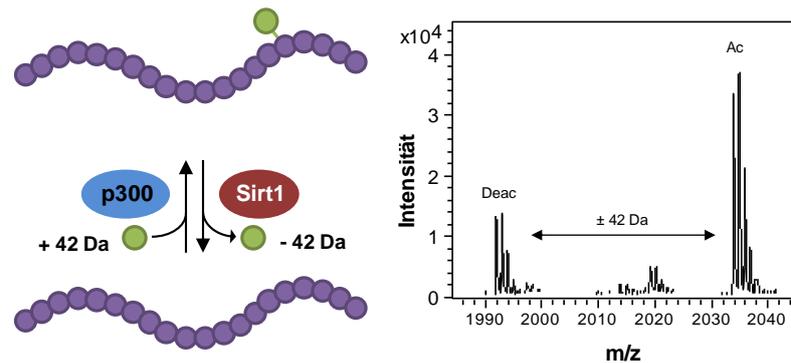
Die Arbeitsgruppe um Wu *et al.* präsentiert für dieses Problem eine Lösung. Demnach kann der tatsächliche  $IC_{50}$ -Wert eines Inhibitors aus dem experimentell ermittelten  $IC_{50}'$ -Wert berechnet werden. Voraussetzung dafür ist, dass der prozentuale Substratumsatz der nicht inhibierten Kontrollreaktion bekannt ist, und es sich um eine enzymatische Reaktion erster Ordnung handelt. Sind beide Voraussetzungen erfüllt, kann der reale  $IC_{50}$ -Wert durch den sogenannten Umsatzfaktor berechnet werden, der in Abhängigkeit zum Substratumsatz der Kontrollreaktion steht (s. 3.2.1.7). (151)

Bei einer enzymatischen Reaktion erster Ordnung ist die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms nur von der Konzentration eines einzelnen Substrates abhängig (154) und nimmt mit zunehmendem Substratumsatz ab. Benötigt ein Enzym mehr als ein Substrat, so kann es in ein Pseudo-Ein-Substrat-System umgewandelt werden, indem das zu untersuchende Substrat in einer deutlich geringeren Konzentration eingesetzt wird als die anderen Substrate. (151, 154) Da  $NAD^+$  in den SIRT1-Reaktionen und Acetyl-CoA in den p300-Reaktionen stets sehr viel höher konzentriert war als das Peptidsubstrat, lag jeweils ein Pseudo-Ein-Substrat-System vor, und die Gleichung zur Korrektur des  $IC_{50}'$ -Wertes (151) konnte verwendet werden.

Auf die Korrektur von  $EC_{50}'$ -Werten wurde von Wu *et al.* nicht eingegangen. (151) In diesem Fall findet der größte Substratumsatz jedoch nicht in der Kontrollreaktion statt, sondern in der Reaktion mit der höchsten Aktivorkonzentration. Deshalb wurde zur Berechnung des Umsatzfaktors für die  $EC_{50}$ -Wert-Ermittlung der prozentuale Substratumsatz bei der jeweils höchsten eingesetzten Aktivorkonzentration verwendet (s. 3.2.1.7).

#### Weitere posttranslationale Modifikationen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantifizierbarkeit einer Peptidacetylierung bzw. -deacetylierung mittels MALDI-TOF MS überprüft. Der durch eine solche posttranslationale Modifikation auftretende Massenunterschied von 42 Da kann im Massenspektrometer auf einfache Weise detektiert werden (Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1: Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Detektion von Acetylierungs- und Deacetylierungsreaktionen**

Das Prinzip dieser Detektionsmethode ist jedoch nicht beschränkt auf eine De-/Acetylierung. Auch andere häufig vorkommende posttranslationale Modifikationen können anhand dieses Prinzips detektiert werden. So ist beispielsweise die De-/Methylierung durch einen Massenshift von 14 Da erkennbar (170), eine De-/Phosphorylierung hingegen verursacht eine Massendifferenz von 80 Da. (171) Dies eröffnet die Möglichkeit, die hier etablierte MALDI-TOF MS-basierte Screening- und Charakterisierungsmethode für eine Reihe weiterer Enzyme zu optimieren, etwa für Kinasen, Phosphatasen oder Methyltransferasen.

## 5.2 Strukturelle Eigenschaften von SIRT1-Modulatoren

### 5.2.1 Artificielle SIRT1-Aktivatoren

Wie bereits erwähnt ist die Aktivierbarkeit von SIRT1 von der Art des verwendeten Peptidsubstrates abhängig (s. 5.1.2). Somit können je nach eingesetztem Peptid unterschiedliche Substanzen aktivierend auf SIRT1 wirken. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, welche gemeinsamen Eigenschaften Substanzen aufweisen, die SIRT1 unter Anwesenheit des AMC-Peptides artifiziell aktivieren. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl RSV als auch NP9 in  $\text{HCO}_3^-$ -haltigem ddH<sub>2</sub>O die Eigenschaft besitzen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu generieren. Dies ging wiederum mit dem Verlust ihrer SIRT1-aktivierenden Funktion einher (s. 4.3.2.4).

Interessanterweise besitzen auch die Naturstoffe Quercetin, Myricetin (172), Epigallocatechingallat (EGCG) und Epicatechingallat (ECG) die Fähigkeit, in verschiedenen Pufferlösungen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu generieren. (173, 174) Der Grund dafür

liegt vermutlich in der Oxidation der zahlreich vorhandenen Hydroxylgruppen. (172, 173) Betrachtet man die Eigenschaften all dieser Substanzen bezüglich SIRT1, so wirken NP9, RSV, Quercetin und ECG aktivierend, Myricetin (175) und EGCG (175, 176) hingegen inhibierend unter Einsatz des AMC-Peptides. Allerdings konnte der Zusatz von Vitamin C die inhibierenden Effekte von Myricetin (175) und EGCG (175, 176) in aktivierende Effekte umwandeln. Auf die SIRT1-aktivierenden Eigenschaften von RSV, Quercetin und ECG hatte Vitamin C hingegen keinen Einfluss. (175)

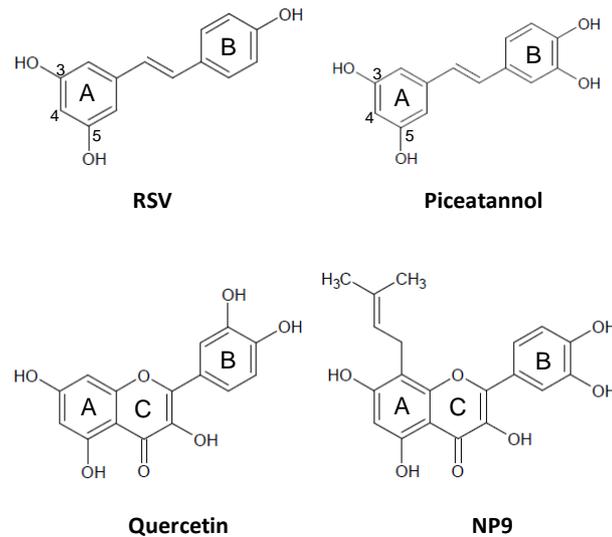
Die Ursache für diese Beobachtungen könnte in der Stabilität der untersuchten Moleküle liegen. ECG weist eine deutlich höhere Stabilität als EGCG auf. (177) Weiterhin zeigt ein Vergleich von RSV und EGCG, dass RSV in diversen Pufferlösungen stabiler ist als EGCG. So produziert EGCG in einer kürzeren Zeitspanne deutlich größere Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  als RSV. Außerdem spielt bei der Oxidation von RSV vor allem  $\text{HCO}_3^-$  eine Rolle, während EGCG zudem in HEPES- und Tris-gepufferten Lösungen  $\text{H}_2\text{O}_2$  generiert. (161) Werden RSV und EGCG in einer SIRT1-Reaktion auf ihre Enzym-modulierenden Eigenschaften hin untersucht, so kann RSV somit seiner Aufgabe ungehindert nachgehen, während EGCG vermutlich bereits oxidiert wurde, da der gängige SIRT1-Reaktionspuffer Tris beinhaltet. (116, 175, 176) Dies könnte auch die Resultate bezüglich Vitamin C erklären: Während es EGCG vermutlich stabilisiert, besteht dafür bei RSV keine Notwendigkeit. (175)

Somit scheinen Moleküle, die SIRT1 unter Anwesenheit des AMC-Peptides aktivieren, eine strukturelle Gemeinsamkeit aufzuweisen: Sie besitzen Hydroxylgruppen, die unter bestimmten Pufferbedingungen zur Oxidation fähig sind. Diese Eigenschaft wird möglicherweise dadurch begünstigt, dass die Hydroxylgruppen an einen Benzolring gebunden sind. Von entscheidender Bedeutung für die SIRT1-Aktivierung ist jedoch, dass noch keine Oxidation stattgefunden hat und das Molekül in voller Integrität vorliegt. Dies wird anhand des Moleküls EGCG deutlich, welches nur SIRT1-aktivierend wirkt wenn dessen Oxidation durch Vitamin C verhindert wird. All dies weist darauf hin, dass durch die intakten Hydroxylgruppen eine optimale Positionierung des Moleküls an Peptid und SIRT1 erfolgt, was wiederum eine Aktivierung von SIRT1 nach sich zieht.

Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich weiterhin die Frage, inwieweit die erwähnten Moleküle in Zellkulturexperimenten eine Wirksamkeit aufweisen

können, da auch Zellkulturmedien gepufferte Lösungen darstellen. Viele Studien, die sich mit der Bildung von  $H_2O_2$  durch bestimmte Substanzen auseinandersetzen, verwenden dafür jedoch gepufferte Lösungen ohne den Zusatz von FBS. (161, 162, 178) Allerdings konnte gezeigt werden, dass EGCG durch Bindung an Serumalbumin sowie durch dessen antioxidative Eigenschaften stabilisiert wird. (179) Auch für RSV wurde eine Bindung an Serumalbumin bestätigt. (180) Auf diese Weise könnte FBS auch bei anderen Substanzen entscheidend zu deren Integrität in Zellkulturmedien beitragen. (161)

Eine weitere Studie von Gertz *et al.* zeigt anhand von Kristallstrukturen aus SIRT5, AMC-Peptid und RSV bzw. aus SIRT3, AMC-Peptid und Piceatannol, dass der B-Ring der Substanzen für die Interaktion mit dem Enzym-Substrat-Komplex von Bedeutung ist, während die Positionen 3 bis 5 des A-Ringes (Abbildung 5-2) der Pufferlösung ausgesetzt sind. (169) In diesem A-Ring scheint die Erklärung dafür zu liegen, warum NP9 SIRT1 stärker aktiviert als RSV. Vergleicht man Quercetin, welches die Grundstruktur von NP9 darstellt, mit RSV, so weist es laut (115) bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  eine geringere Aktivierung von SIRT1 auf als  $100 \mu\text{M}$  RSV (4,59- vs. 13,4-fache Stimulation). (115) Da der Prenylrest am A-Ring den einzigen strukturellen Unterschied zwischen Quercetin und NP9 darstellt (Abbildung 5-2), scheint dieser dafür verantwortlich zu sein, dass NP9 im Vergleich zu RSV ein stärkerer artifizieller SIRT1-Aktivator ist als Quercetin. Möglicherweise beeinflusst der Prenylrest dabei die Positionierung des artifiziellen Aktivators am SIRT1-Substrat-Komplex, und auf diese Weise die Effizienz des Substratumsatzes. Um diese Theorie überprüfen zu können ist jedoch die Generierung von Kristallstrukturen der jeweiligen Moleküle im Komplex mit SIRT1 und dem AMC-Peptid erforderlich.



**Abbildung 5-2: Strukturvergleich der artifiziiellen SIRT1-Aktivatoren RSV, Piceatannol, Quercetin und NP9**

### 5.2.2 SIRT1-Inhibitoren

Die Hemmung des Enzyms SIRT1 ist auf verschiedene Arten möglich. So können Inhibitoren etwa die Bindungstasche des Peptidsubstrates blockieren, oder aber die  $\text{NAD}^+$ -Bindungstasche (s. 1.2.4.2.1). Da bei dem Screening in der vorliegenden Arbeit die Peptidkonzentration sehr gering gewählt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den identifizierten Substanzen entweder um kompetitive Inhibitoren bezüglich des Peptidsubstrates oder um nichtkompetitive Inhibitoren handelt (s. 5.1.3).

Bei genauerer Betrachtung der chemischen Strukturen der SIRT1-Inhibitoren wird deutlich, dass der Hälfte der Substanzen eine Flavonoidstruktur zugrunde liegt (NPs 2-5; Tabelle 4-2). Dies erinnert an die Strukturen der artifiziiellen SIRT1-Aktivatoren (s. 5.2.1) und insbesondere an EGCG, das nur unter Anwesenheit von Vitamin C einen SIRT1-aktivierenden Effekt auslösen kann, ohne das Antioxidans jedoch inhibierend wirkt. (175, 176) Zieht man weiterhin den jüngst propagierten Mechanismus der Aktivierung bzw. Inhibierung von Sirtuinen (s. 5.1.2; (169)) in Betracht so besteht die Möglichkeit, dass auch die Inhibitoren an das Enzym und den C-Terminus des Peptidsubstrates binden. Der hemmende Effekt würde dann darin begründet liegen, dass das Peptid auf diese Weise in eine für die Deacetylierung ungünstige Position gebracht wird. (169) Interessant wäre an

dieser Stelle, ob die Substanzen auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierende Eigenschaften besitzen; und sollte dies der Fall sein, ob sie unter Verwendung des AMC-Peptides sowie von Vitamin C eine SIRT1-Aktivierung hervorrufen können. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre zudem die Überprüfung der strukturellen Integrität der Moleküle mittels NMR-Spektroskopie vor bzw. nach einer Inkubation in verschiedenen Pufferlösungen.

Da auch die anderen SIRT1-Inhibitoren mehrere Hydroxylgruppen aufweisen wäre auch für diese ein Inhibierungsmechanismus denkbar, der darauf basiert, dass die oxidierten Substanzen das acetylierte Peptid in eine ungünstige Position zu SIRT1 bringen (s. o.). Um jedoch auf den exakten Inhibierungsmechanismus der detektierten Substanzen schließen zu können, wären weitere enzymkinetische Messungen erforderlich.

### **5.3 Zelluläre Effekte der SIRT1-Modulatoren**

#### **5.3.1 Bestimmung der Cytotoxizität**

Für die im Screening detektierten SIRT1-Modulatoren wurde anhand der Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes ermittelt, welchen Einfluss die Substanzen auf die Proliferation der Zellen ausüben. Obwohl ein reduzierter ATP-Gehalt neben dem Zelltod auch durch ein verlangsamtes Zellwachstum hervorgerufen werden kann (181), wurde bei einer auf weniger als 80% reduzierten Proliferationsrate generell ein cytotoxischer Effekt der jeweiligen Substanz angenommen. Cytotoxische Substanzen wurden für weitere Experimente aussortiert um nekrotische Effekte ausschließen zu können. Besonders im Hinblick auf die SIRT1-Inhibitoren ist jedoch eine gezielt in Tumorzellen ausgelöste Apoptose von Interesse. In diesem Kontext bietet sich eine weitere Überprüfung der Substanzen NP 6-8 auf Effekte in Tumorzelllinien an. Durch spezifische Experimente, etwa einer Bestimmung der Caspase-aktivitäten oder der Aufnahme des Farbstoffes Propidiumiodid durch die beschädigte Zellmembran, kann genauer zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden. (181)

### **5.3.2 NP1-vermittelte Induktion der p53-Acetylierung**

Um den Einfluss des stärksten ermittelten SIRT1-Inhibitors NP1 auf die Acetylierung von p53 am Lysinrest 382 zu überprüfen, wurde die HepG2-Zelllinie herangezogen, da in dieser ein funktionales, nicht mutiertes p53 exprimiert wird. (182) Da der p53-Status in ungestressten Zellen durch Ubiquitinierung und Abbau des Proteins generell auf einem geringen Niveau gehalten wird (183) und erst durch DNA-Schädigung eine Acetylierung am Lysin 382 hervorgerufen wird (184), wurden die Zellen neben dem Inhibitor mit dem Cytostatikum Etoposid behandelt. Durch diese Substanz wird ein gut messbarer, basaler Acetylierungsstatus von p53 am Lysin 382 hervorgerufen, der es ermöglicht, Veränderungen desselben nach Einsatz von SIRT1-Inhibitoren zu überprüfen. (156, 185) Auf diese Weise konnte eine durch NP1 ausgelöste Steigerung der p53-Acetylierung in der Kernfraktion der HepG2-Zellen detektiert werden (Abbildung 4-22), was somit auch im zellulären Kontext auf eine SIRT1-Inhibierung durch NP1 hinweist. Dass mit einer Acetylierung von p53 am Lysin 382 u. a. eine gesteigerte DNA-Bindung von p53 in Verbindung gebracht wird (186), könnte eine Erklärung dafür sein, warum die vermehrte Acetylierung nur im Zellkern sichtbar war.

Dieses Experiment diente primär dazu, die Inhibierung von SIRT1 durch NP1 in einem zellulären System an einem gut definierten Zielprotein (20) zu überprüfen. Da sowohl SIRT1-Inhibitoren als auch das Protein p53 in der Entwicklung von Tumoren eine Rolle spielen, bietet es sich an, weitere Untersuchungen in diese Richtung durchzuführen. In diesem Zusammenhang sind z. B. Experimente zur Überprüfung des Zellzyklus', aber auch Versuche, die eine mögliche Apoptoseinduktion durch die Substanzen erkennbar machen, denkbar.

### **5.3.3 NP9-vermittelte Reduktion der TNF $\alpha$ -Freisetzung**

In einem zellbasierten Versuch wurde überprüft, welchen Einfluss der artifizielle SIRT1-Aktivator NP9 auf die TNF $\alpha$ -Freisetzung aus LPS-stimulierten THP-1-Monocyten ausübt. Hintergrund dieses Versuchsansatzes ist, dass SIRT1 den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B durch Deacetylierung hemmen (22), und auf diese Weise einen Effekt auf nachfolgende Inflammationsprozesse ausüben kann. (153, 187)

Das Ergebnis zeigte eine starke Unterdrückung der TNF $\alpha$ -Freisetzung durch NP9 (Abbildung 4-25). Allerdings stellt sich die Frage, durch welchen zellulären

Mechanismus der beobachtete Effekt hervorgerufen wurde. Zwar handelt es sich bei NP9 um einen Aktivator von SIRT1 (Abbildung 4-24), dieser wurde jedoch auf artifizielle Weise unter Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Peptides ermittelt. Die tatsächliche Wirkung von NP9 auf SIRT1 im zellulären Kontext ist somit fraglich.

Eine naheliegendere Erklärung für die reduzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung stellt die Tatsache dar, dass NP9 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,7  $\mu$ M (Abbildung 4-30) der bislang stärkste bekannte Inhibitor von p300 ist. (188, 189) Diese Histonacetyltransferase ist der enzymatische Gegenspieler von SIRT1, auch in Hinsicht auf NF $\kappa$ B. (22, 190, 191) Das bedeutet, dass durch eine Hemmung von p300 derselbe Effekt wie durch eine Aktivierung von SIRT1 ausgelöst werden könnte, nämlich eine verminderte NF $\kappa$ B-Acetylierung, sowie daraus resultierend eine reduzierte Freisetzung von TNF $\alpha$ .

Auch andere Studien mit artifiziellen SIRT1-Aktivatoren konnten in vergleichbaren Versuchsanordnungen eine reduzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung aus humanen oder murinen Monozyten bzw. Makrophagen verzeichnen. (153, 187, 192) Für einige dieser Substanzen (SRT1720, SRTCX1003) ist jedoch auch eine inhibierende Funktion auf p300 bekannt. (192, 193) Während in der Studie über SRT1720 jedoch durch einen SIRT1-Knockdown gezeigt wurde, dass ein Einfluss von p300 auf das Ergebnis unwahrscheinlich ist (187), spricht in der Studie über SRTCX1003 viel für eine Beteiligung von p300. So konnte durch einen SIRT1-Knockdown der Effekt der Substanz nicht vollständig rückgängig gemacht werden. Außerdem liegt der IC<sub>50</sub>-Wert von SRTCX1003 bezüglich p300 bei 11  $\mu$ M, was mit dem IC<sub>50</sub>-Wert von 12,52  $\mu$ M für die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Sekretion sehr gut übereinstimmt. (192)

Die Ergebnisse zeigen, dass auch durch einen p300-vermittelten Effekt die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Freisetzung reduziert werden könnte. Allerdings gibt es auch Hinweise auf einen SIRT1-vermittelten Effekt. In diesem Zusammenhang wäre die Überprüfung einer möglichen SIRT1-Aktivierung mit NF $\kappa$ B als Substrat sinnvoll (s. 5.1.2). Weiterhin könnte eine Knockdown-Analyse bezüglich SIRT1 und p300 tiefere Erkenntnisse über den tatsächlichen Mechanismus mit sich bringen.

## 5.4 Schlussfolgerung

Die im Rahmen des Screenings ermittelten Substanzen bieten vielfältige Möglichkeiten für weitergehende Untersuchungen. So können etwa die SIRT1-Inhibitoren auf ihren genauen Wirkmechanismus in Krebszellen hin untersucht werden. Aber auch ihr Einfluss bezüglich der Entwicklung von Ängsten und Depressionen ist in diesem Zusammenhang von Interesse.

Was den neuen artifiziellen SIRT1-Aktivator betrifft gilt es zunächst die Frage zu klären, ob durch ihn tatsächlich eine Aktivierung von SIRT1 ausgelöst werden kann. Da eine Aktivierung von Sirtuinen von der Art des Peptid-/Proteinsubstrates abhängig zu sein scheint (169), erfordert diese Fragestellung eine Untersuchung verschiedenster natürlicher Peptidsequenzen in der SIRT1-Reaktion. Erst wenn ein natürliches Peptid gefunden wird das eine Aktivierung von SIRT1 durch NP9 erlaubt, kann in Abhängigkeit des Zielproteins auf die jeweils hervorgerufenen Gesundheitseffekte geschlossen werden. Durch NP9 verursachte zelluläre Effekte könnten allerdings auch durch eine Hemmung des enzymatischen SIRT1-Gegenspielers p300 hervorgerufen werden, da es sich bei NP9 um den bislang stärksten bekannten p300-Inhibitor handelt. (188, 189)

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte MALDI-TOF MS-basierte Methode weist gegenüber herkömmlichen Methoden etliche Vorteile auf:

An erster Stelle ist dabei die Verlässlichkeit der Methode zu erwähnen. Die Methode ermöglicht die direkte Detektion unmarkierter Substrate und/oder Produkte einer enzymatischen Reaktion. Da zudem eine mögliche Autofluoreszenz untersuchter Substanzen in der Massenspektrometrie keine Rolle spielt ist eine zuverlässige Detektion von Screeninghits möglich, sowie eine weitergehende Charakterisierung derselben.

Ein weiterer Pluspunkt der MALDI-TOF MS-basierten Methode ist die im Gegensatz zur ESI MS vergleichsweise einfache Anwendbarkeit, die es auch Personen ohne besonderes Fachwissen ermöglicht, diese Methode anzuwenden.

Ein dritter Vorteil ist die große Flexibilität der Methode. Diese wird etwa daraus ersichtlich, dass die unterschiedlichsten Peptidsubstrate eingesetzt werden können. So besteht einerseits die Möglichkeit, unter Verwendung eines natürlichen Peptides ein artefaktfreies Screening durchzuführen. Andererseits kann aber auch ein markiertes Peptid eingesetzt werden, um mögliche Artefakte

zu überprüfen. Die Flexibilität der Methode zeigt sich zudem darin, dass unter Verwendung geeigneter Peptide neben SIRT1 noch eine Vielzahl anderer posttranslational agierender Enzyme untersucht werden kann. Dies können zum einen andere Sirtuine und HDACs sein sowie Enzyme, die die Umkehrreaktion katalysieren. Zum anderen ist es möglich, die MALDI-TOF MS bei der Ermittlung von Phosphatase-, Kinase- oder Methyltransferase-Modulatoren einzusetzen. Dieses breite Anwendungsspektrum zeigt die große Bedeutung dieser Methode für die Untersuchung diverser enzymatischer Reaktionen auf.

## 6 Zusammenfassung

Die zunehmende Alterung unserer Gesellschaft hat zur Folge, dass altersbedingte Erkrankungen, wie z. B. Typ-2 Diabetes, vermehrt auftreten. Dies bringt sowohl wirtschaftliche als auch große soziale Probleme mit sich. Ernährungsbezogene Präventionsansätze befassen sich daher u. a. mit dem Einfluss von Nahrungsbestandteilen auf die Expression krankheitsrelevanter Gene. Die Deacetylase SIRT1, die durch kleine Moleküle in ihrer Aktivität reguliert werden kann, steuert diverse Stoffwechselprozesse, die mit altersbedingten Erkrankungen in Verbindung stehen. In der Vergangenheit wurden verschiedene Screeningmethoden zur Detektion SIRT1-modulierender Substanzen entwickelt. Allerdings weisen viele der verfügbaren SIRT1-Screeningmethoden Nachteile auf, etwa die Generierung von Artefakten aufgrund von Fluoreszenzdetektion und/oder -markierung. Um dieses Problem zu lösen wurde in der vorliegenden Arbeit eine MALDI-TOF MS-basierte Screeningmethode entwickelt. Anhand dieser Methode kann die Deacetylierung eines Peptidsubstrates aufgrund seiner um 42 Da verringerten Masse detektiert werden, ohne dass eine Substratmarkierung erforderlich ist. Die Methode wurde so optimiert, um sie einerseits als Hochdurchsatz-Screeningmethode, und andererseits zur nachfolgenden Charakterisierung der ermittelten SIRT1-Modulatoren verwenden zu können. Die Methodenentwicklung sowie das Screening einer Naturstoffbibliothek wurden mit einem unmarkierten und mit einem fluoreszenzmarkierten Peptid durchgeführt. Das unmarkierte Peptid diente dabei der Erzielung artefaktfreier Ergebnisse. Das fluoreszenzmarkierte Peptid wurde hingegen zur Detektion artifizierlicher SIRT1-Aktivatoren eingesetzt, um strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen SIRT1-Aktivatoren aufzeigen zu können. Aus dem Screening resultierten acht SIRT1-Inhibitoren und ein artifizierlicher SIRT1-Aktivator. Diese Substanzen wurden *in vitro* und in verschiedenen Zellsystemen überprüft. Dabei zeigte der stärkste SIRT1-Inhibitor NP1 im Zellsystem eine reduzierte p53-Deacetylierung. Der artifizierliche SIRT1-Aktivator NP9, der mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1,7  $\mu$ M zudem ein sehr starker p300-Inhibitor ist, wies eine stark antiinflammatorische Wirkung auf. Anhand der Histonacetyltransferase p300 wurde gezeigt, dass die MALDI-TOF MS Methode sich auch zur Detektion der Umkehrreaktion eignet. Zudem bietet die Methode die Möglichkeit, die Aktivität vieler weiterer posttranslationaler Enzyme zu messen.

## 7 Summary

The progressive increase in life expectancies of our society results in an increasing prevalence of age-related diseases like type-2 diabetes. This causes economic as well as vast social problems. Therefore, nutrition related preventive approaches include for example the influence of dietary components on the expression of disease related genes. The deacetylase SIRT1 can be regulated by small molecules and controls several metabolic processes that influence age-related diseases. Several methods to screen for SIRT1 modulating compounds have been developed in the past. However, many of the available SIRT1 screening methods bear disadvantages such as artifact generation because of fluorescence detection and/or labeling. Hence, in the present work a more advantageous MALDI-TOF MS based screening method was developed. Applying this method, deacetylation of a peptide substrate can be detected by a 42 Da mass shift without the need of any substrate labeling. The method was optimized to serve as a high-throughput screening system as well as for subsequent characterization of detected SIRT1 modulators. Method development as well as screening of a natural product library was conducted using an unlabeled and a fluorescently labeled peptide. The unlabeled peptide was used to generate artifact-free results. In contrast, the fluorescently labeled peptide was applied for the detection of artificial SIRT1 activators, in order to demonstrate structural similarities to other SIRT1 activating compounds. The screening resulted in eight SIRT1 inhibitors and one artificial SIRT1 activator. These compounds were further tested *in vitro* and in different cell lines. Cell treatment with the most potent SIRT1 inhibitor NP1 revealed reduced p53 deacetylation. The artificial SIRT1 activator compound NP9, which is also a very strong inhibitor of p300 with an IC<sub>50</sub> value of 1.7 μM, showed a strong antiinflammatory effect. By employing the histone acetyltransferase p300, the applicability of the MALDI-TOF MS based method for the reverse reaction was demonstrated. Moreover, the presented method provides the opportunity to measure the activity of many other post-translationally active enzymes.

## 8 Literatur

1. *Bevölkerung Deutschlands bis 2060 - 12. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung*, 2009, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden.
2. *Demography Report 2010 - Older, more numerous and diverse Europeans*, EUROPEAN COMMISSION, Editor 2011, European Union: Luxembourg.
3. *World Population Ageing 2009*, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS - POPULATION DIVISION, Editor 2009, United Nations: New York.
4. SAß, A.-C., WURM, S., ZIESE, T., *Alter = Krankheit? Gesundheitszustand und Gesundheitsentwicklung*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit und Krankheit im Alter*, DEUTSCHES ZENTRUM FÜR ALTERSFRAGEN STATISTISCHES BUNDESAMT, ROBERT KOCH-INSTITUT, Herausgeber. 2009, Robert Koch-Institut: Berlin. S. 31-61.
5. GABRIELY, I., BARZILAI, N., *The role of fat cell derived peptides in age-related metabolic alterations*. Mech Ageing Dev, 2001. **122** (14): S. 1565-76.
6. TESCH-RÖMER, C., WURM, S., *Wer sind die Alten? Theoretische Positionen zum Alter und Altern*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit und Krankheit im Alter*, DEUTSCHES ZENTRUM FÜR ALTERSFRAGEN STATISTISCHE BUNDESAMT, ROBERT KOCH-INSTITUT, Herausgeber. 2009, Robert Koch-Institut: Berlin. S. 7-20.
7. *Gesundheit im Alter*, 2012, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden.
8. NÖTHEN, M., BÖHM, K., *Wie teuer wird das Altern? Ökonomische Chancen und Herausforderungen einer alternden Gesellschaft*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit und Krankheit im Alter*, DEUTSCHES ZENTRUM FÜR ALTERSFRAGEN STATISTISCHES BUNDESAMT, ROBERT KOCH-INSTITUT, Herausgeber. 2009, Rober Koch-Institut: Berlin. S. 228-246.
9. SCHÜTZ, B., WURM, S., *Gesundheit im Alter bedingt durch Schicksal, Schichtzugehörigkeit oder Verhalten? Gesundheitsrelevante Lebenslagen und Lebensstile*, in *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Gesundheit und Krankheit im Alter*, DEUTSCHES ZENTRUM FÜR

- ALTERSFRAGEN STATISTISCHES BUNDESAMT, ROBERT KOCH-INSTITUT, Herausgeber. 2009, Robert Koch-Institut: Berlin. S. 160-166.
10. SZARC VEL SZIC, K., NDLOVU, M.N., HAEGEMAN, G., VANDEN BERGHE, W., *Nature or nurture: let food be your epigenetic medicine in chronic inflammatory disorders*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80** (12): S. 1816-32.
  11. MCGEE, S.L., HARGREAVES, M., *Histone modifications and exercise adaptations*. *J Appl Physiol*, 2011. **110** (1): S. 258-63.
  12. MASTALOUDIS, A., WOOD, S.M., *Age-related changes in cellular protection, purification, and inflammation-related gene expression: role of dietary phytonutrients*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1259**: S. 112-20.
  13. MULLER, M., KERSTEN, S., *Nutrigenomics: goals and strategies*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4** (4): S. 315-22.
  14. JENUWEIN, T., ALLIS, C.D., *Translating the histone code*. *Science*, 2001. **293** (5532): S. 1074-80.
  15. FEIGE, J.N., AUWERX, J., *DisSIRTING on LXR and cholesterol metabolism*. *Cell Metab*, 2007. **6** (5): S. 343-5.
  16. CHOI, S.W., FRISO, S., *Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health*. *Adv Nutr*, 2010. **1** (1): S. 8-16.
  17. PARK, L.K., FRISO, S., CHOI, S.W., *Nutritional influences on epigenetics and age-related disease*. *Proc Nutr Soc*, 2012. **71** (1): S. 75-83.
  18. YANG, X.J., SETO, E., *HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention*. *Oncogene*, 2007. **26** (37): S. 5310-8.
  19. PESERICO, A., SIMONE, C., *Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: S. 371832.
  20. 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): S. 137-48.
  21. GU, W., ROEDER, R.G., *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain*. *Cell*, 1997. **90** (4): S. 595-606.
  22. 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): S. 2369-80.

23. FURIA, B., DENG, L., WU, K., BAYLOR, S., KEHN, K., LI, H., DONNELLY, R., COLEMAN, T., KASHANCHI, F., *Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins*. J Biol Chem, 2002. **277** (7): S. 4973-80.
24. STERNER, D.E., BERGER, S.L., *Acetylation of histones and transcription-related factors*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64** (2): S. 435-59.
25. FURDAS, S.D., KANNAN, S., SIPPL, W., JUNG, M., *Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates*. Arch Pharm (Weinheim), 2012. **345** (1): S. 7-21.
26. CHEN, J., LI, Q., *Life and death of transcriptional co-activator p300*. Epigenetics, 2011. **6** (8): S. 957-61.
27. LIU, X., WANG, L., ZHAO, K., THOMPSON, P.R., HWANG, Y., MARMORSTEIN, R., COLE, P.A., *The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator*. Nature, 2008. **451** (7180): S. 846-50.
28. THOMPSON, P.R., WANG, D., WANG, L., FULCO, M., PEDICONI, N., ZHANG, D., AN, W., GE, Q., ROEDER, R.G., WONG, J., LEVRERO, M., SARTORELLI, V., COTTER, R.J., COLE, P.A., *Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11** (4): S. 308-15.
29. KARANAM, B., WANG, L., WANG, D., LIU, X., MARMORSTEIN, R., COTTER, R., COLE, P.A., *Multiple roles for acetylation in the interaction of p300 HAT with ATF-2*. Biochemistry, 2007. **46** (28): S. 8207-16.
30. GREGORETTI, I.V., LEE, Y.M., GOODSON, H.V., *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis*. J Mol Biol, 2004. **338** (1): S. 17-31.
31. SCHULTZ, B.E., MISIALEK, S., WU, J., TANG, J., CONN, M.T., TAHILRAMANI, R., WONG, L., *Kinetics and comparative reactivity of human class I and class IIb histone deacetylases*. Biochemistry, 2004. **43** (34): S. 11083-91.
32. FRYE, R.A., *Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273** (2): S. 793-8.
33. HOUTKOOPER, R.H., PIRINEN, E., AUWERX, J., *Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13** (4): S. 225-38.
34. RINE, J., STRATHERN, J.N., HICKS, J.B., HERSKOWITZ, I., *A suppressor of mating-type locus mutations in Saccharomyces cerevisiae: evidence for*

- and identification of cryptic mating-type loci.* Genetics, 1979. **93** (4): S. 877-901.
35. FINKEL, T., DENG, C.X., MOSTOSLAVSKY, R., *Recent progress in the biology and physiology of sirtuins.* Nature, 2009. **460** (7255): S. 587-91.
  36. MCCAY, C.M., CROWELL, M.F., MAYNARD, L.A., *The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size.* 1935. Nutrition, 1989. **5** (3): S. 155-71; discussion 172.
  37. LIN, S.J., DEFOSSEZ, P.A., GUARENTE, L., *Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae.* Science, 2000. **289** (5487): S. 2126-8.
  38. SCHULZ, T.J., ZARSE, K., VOIGT, A., URBAN, N., BIRNINGER, M., RISTOW, M., *Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress.* Cell Metab, 2007. **6** (4): S. 280-93.
  39. ROGINA, B., HELFAND, S.L., FRANKEL, S., *Longevity regulation by Drosophila Rpd3 deacetylase and caloric restriction.* Science, 2002. **298** (5599): S. 1745.
  40. KAEBERLEIN, M., MCVEY, M., GUARENTE, L., *The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms.* Genes Dev, 1999. **13** (19): S. 2570-80.
  41. TISSENBAUM, H.A., GUARENTE, L., *Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in Caenorhabditis elegans.* Nature, 2001. **410** (6825): S. 227-30.
  42. ROGINA, B., HELFAND, S.L., *Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (45): S. 15998-6003.
  43. KAEBERLEIN, M., POWERS, R.W., 3RD, *Sir2 and calorie restriction in yeast: a skeptical perspective.* Ageing Res Rev, 2007. **6** (2): S. 128-40.
  44. BURNETT, C., VALENTINI, S., CABREIRO, F., GOSS, M., SOMOGYVARI, M., PIPER, M.D., HODDINOTT, M., SUTPHIN, G.L., LEKO, V., MCELWEE, J.J., VAZQUEZ-MANRIQUE, R.P., ORFILA, A.M., ACKERMAN, D., AU, C., VINTI, G., RIESEN, M., HOWARD, K., NERI, C., BEDALOV, A., KAEBERLEIN, M., SOTI, C., PARTRIDGE, L., GEMS, D., *Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in C. elegans and Drosophila.* Nature, 2011. **477** (7365): S. 482-5.

45. VISWANATHAN, M., GUARENTE, L., *Regulation of Caenorhabditis elegans lifespan by sir-2.1 transgenes*. Nature, 2011. **477** (7365): S. E1-2.
46. SUN, L., SADIGHI AKHA, A.A., MILLER, R.A., HARPER, J.M., *Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64** (7): S. 711-22.
47. DHAHBI, J.M., KIM, H.J., MOTE, P.L., BEAVER, R.J., SPINDLER, S.R., *Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (15): S. 5524-9.
48. BOILY, G., SEIFERT, E.L., BEVILACQUA, L., HE, X.H., SABOURIN, G., ESTEY, C., MOFFAT, C., CRAWFORD, S., SALIBA, S., JARDINE, K., XUAN, J., EVANS, M., HARPER, M.E., MCBURNEY, M.W., *Sirt1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice*. PLoS One, 2008. **3** (3): S. e1759.
49. BORDONE, L., COHEN, D., ROBINSON, A., MOTTA, M.C., VAN VEEN, E., CZOPIK, A., STEELE, A.D., CROWE, H., MARMOR, S., LUO, J., GU, W., GUARENTE, L., *SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction*. Aging Cell, 2007. **6** (6): S. 759-67.
50. HERRANZ, D., MUNOZ-MARTIN, M., CANAMERO, M., MULERO, F., MARTINEZ-PASTOR, B., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., SERRANO, M., *Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer*. Nat Commun, 2010. **1**: S. 3.
51. RODGERS, J.T., LERIN, C., HAAS, W., GYGI, S.P., SPIEGELMAN, B.M., PUIGSERVER, P., *Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1*. Nature, 2005. **434** (7029): S. 113-8.
52. LIU, Y., DENTIN, R., CHEN, D., HEDRICK, S., RAVNSKJAER, K., SCHENK, S., MILNE, J., MEYERS, D.J., COLE, P., YATES, J., 3RD, OLEFSKY, J., GUARENTE, L., MONTMINY, M., *A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange*. Nature, 2008. **456** (7219): S. 269-73.
53. BORDONE, L., MOTTA, M.C., PICARD, F., ROBINSON, A., JHALA, U.S., APFELD, J., MCDONAGH, T., LEMIEUX, M., MCBURNEY, M., SZILVASI, A., EASLON, E.J., LIN, S.J., GUARENTE, L., *Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells*. PLoS Biol, 2006. **4** (2): S. e31.

54. SUN, C., ZHANG, F., GE, X., YAN, T., CHEN, X., SHI, X., ZHAI, Q., *SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B*. Cell Metab, 2007. **6** (4): S. 307-19.
55. PICARD, F., KURTEV, M., CHUNG, N., TOPARK-NGARM, A., SENAWONG, T., MACHADO DE OLIVEIRA, R., LEID, M., MCBURNEY, M.W., GUARENTE, L., *Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma*. Nature, 2004. **429** (6993): S. 771-6.
56. STEIN, S., MATTER, C.M., *Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis*. Cell Cycle, 2011. **10** (4): S. 640-7.
57. LI, X., ZHANG, S., BLANDER, G., TSE, J.G., KRIEGER, M., GUARENTE, L., *SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR*. Mol Cell, 2007. **28** (1): S. 91-106.
58. CHEN, J., ZHOU, Y., MUELLER-STEINER, S., CHEN, L.F., KWON, H., YI, S., MUCKE, L., GAN, L., *SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling*. J Biol Chem, 2005. **280** (48): S. 40364-74.
59. BROOKS, C.L., GU, W., *How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer?* Nat Rev Cancer, 2009. **9** (2): S. 123-8.
60. LIBERT, S., POINTER, K., BELL, E.L., DAS, A., COHEN, D.E., ASARA, J.M., KAPUR, K., BERGMANN, S., PREISIG, M., OTOWA, T., KENDLER, K.S., CHEN, X., HETTEMA, J.M., VAN DEN OORD, E.J., RUBIO, J.P., GUARENTE, L., *SIRT1 activates MAO-A in the brain to mediate anxiety and exploratory drive*. Cell, 2011. **147** (7): S. 1459-72.
61. FINNIN, M.S., DONIGIAN, J.R., PAVLETICH, N.P., *Structure of the histone deacetylase SIRT2*. Nat Struct Biol, 2001. **8** (7): S. 621-5.
62. AUTIERO, I., COSTANTINI, S., COLONNA, G., *Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein*. PLoS One, 2009. **4** (10): S. e7350.
63. HUHTINIEMI, T., WITTEKINDT, C., LAITINEN, T., LEPPANEN, J., SALMINEN, A., POSO, A., LAHTELA-KAKKONEN, M., *Comparative and pharmacophore model for deacetylase SIRT1*. J Comput Aided Mol Des, 2006. **20** (9): S. 589-99.
64. ZHAO, K., HARSHAW, R., CHAI, X., MARMORSTEIN, R., *Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2*

- histone/protein deacetylases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (23): S. 8563-8.
65. CHANG, J.H., KIM, H.C., HWANG, K.Y., LEE, J.W., JACKSON, S.P., BELL, S.D., CHO, Y., *Structural basis for the NAD-dependent deacetylase mechanism of Sir2*. J Biol Chem, 2002. **277** (37): S. 34489-98.
  66. 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): S. 855-68.
  67. AVALOS, J.L., BOEKE, J.D., WOLBERGER, C., *Structural basis for the mechanism and regulation of Sir2 enzymes*. Mol Cell, 2004. **13** (5): S. 639-48.
  68. HOLBOURN, K.P., LLOYD, M.D., THOMPSON, A.S., THREADGILL, M.D., ACHARYA, K.R., *Cloning, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the human histone deacetylase sirtuin 1*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011. **67** (Pt 4): S. 461-3.
  69. SAUVE, A.A., CELIC, I., AVALOS, J., DENG, H., BOEKE, J.D., SCHRAMM, V.L., *Chemistry of gene silencing: the mechanism of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation reactions*. Biochemistry, 2001. **40** (51): S. 15456-63.
  70. BORRA, M.T., LANGER, M.R., SLAMA, J.T., DENU, J.M., *Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent histone/protein deacetylases*. Biochemistry, 2004. **43** (30): S. 9877-87.
  71. KANG, H., SUH, J.Y., JUNG, Y.S., JUNG, J.W., KIM, M.K., CHUNG, J.H., *Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity*. Mol Cell, 2011. **44** (2): S. 203-13.
  72. NORIEGA, L.G., FEIGE, J.N., CANTO, C., YAMAMOTO, H., YU, J., HERMAN, M.A., MATAKI, C., KAHN, B.B., AUWERX, J., *CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability*. EMBO Rep, 2011. **12** (10): S. 1069-76.
  73. NEMOTO, S., FERGUSSON, M.M., FINKEL, T., *Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway*. Science, 2004. **306** (5704): S. 2105-8.
  74. LYNCH, C.J., SHAH, Z.H., ALLISON, S.J., AHMED, S.U., FORD, J., WARNOCK, L.J., LI, H., SERRANO, M., MILNER, J., *SIRT1 undergoes alternative splicing in a novel auto-regulatory loop with p53*. PLoS One, 2010. **5** (10): S. e13502.

75. SHAH, Z.H., AHMED, S.U., FORD, J.R., ALLISON, S.J., KNIGHT, J.R., MILNER, J., *A deacetylase-deficient SIRT1 variant opposes full-length SIRT1 in regulating tumor suppressor p53 and governs expression of cancer-related genes.* Mol Cell Biol, 2012. **32** (3): S. 704-16.
76. SASAKI, T., MAIER, B., KOCLEGA, K.D., CHRUSZCZ, M., GLUBA, W., STUKENBERG, P.T., MINOR, W., SCRABLE, H., *Phosphorylation regulates SIRT1 function.* PLoS One, 2008. **3** (12): S. e4020.
77. ZSCHOERNIG, B., MAHLKNECHT, U., *Carboxy-terminal phosphorylation of SIRT1 by protein kinase CK2.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381** (3): S. 372-7.
78. GUO, X., WILLIAMS, J.G., SCHUG, T.T., LI, X., *DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1.* J Biol Chem, 2010. **285** (17): S. 13223-32.
79. NASRIN, N., KAUSHIK, V.K., FORTIER, E., WALL, D., PEARSON, K.J., DE CABO, R., BORDONE, L., *JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity.* PLoS One, 2009. **4** (12): S. e8414.
80. GUO, X., KESIMER, M., TOLUN, G., ZHENG, X., XU, Q., LU, J., SHEEHAN, J.K., GRIFFITH, J.D., LI, X., *The NAD(+)-dependent protein deacetylase activity of SIRT1 is regulated by its oligomeric status.* Sci Rep, 2012. **2**: S. 640.
81. HAIGIS, M.C., SINCLAIR, D.A., *Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance.* Annu Rev Pathol, 2010. **5**: S. 253-95.
82. HOUTKOOPER, R.H., AUWERX, J., *Exploring the therapeutic space around NAD+.* J Cell Biol, 2012. **199** (2): S. 205-9.
83. BIEGANOWSKI, P., BRENNER, C., *Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans.* Cell, 2004. **117** (4): S. 495-502.
84. KIM, M.Y., ZHANG, T., KRAUS, W.L., *Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal.* Genes Dev, 2005. **19** (17): S. 1951-67.
85. CANTO, C., JIANG, L.Q., DESHMUKH, A.S., MATAKI, C., COSTE, A., LAGOUGE, M., ZIERATH, J.R., AUWERX, J., *Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle.* Cell Metab, 2010. **11** (3): S. 213-9.

86. BITTERMAN, K.J., ANDERSON, R.M., COHEN, H.Y., LATORRE-ESTEVEZ, 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): S. 45099-107.
87. JACKSON, M.D., SCHMIDT, M.T., OPPENHEIMER, N.J., DENU, J.M., *Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosidation by Sir2 histone/protein deacetylases*. J Biol Chem, 2003. **278** (51): S. 50985-98.
88. ANDERSON, R.M., BITTERMAN, K.J., WOOD, J.G., MEDVEDIK, O., SINCLAIR, D.A., *Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2003. **423** (6936): S. 181-5.
89. KIM, E.J., KHO, J.H., KANG, M.R., UM, S.J., *Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity*. Mol Cell, 2007. **28** (2): S. 277-90.
90. KIM, J.E., CHEN, J., LOU, Z., *DBC1 is a negative regulator of SIRT1*. Nature, 2008. **451** (7178): S. 583-6.
91. ZHAO, W., KRUSE, J.P., TANG, Y., JUNG, S.Y., QIN, J., GU, W., *Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1*. Nature, 2008. **451** (7178): S. 587-90.
92. LANDRY, J., SLAMA, J.T., STERNGLANZ, R., *Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278** (3): S. 685-90.
93. NEUGEBAUER, R.C., SIPPL, W., JUNG, M., *Inhibitors of NAD+ dependent histone deacetylases (sirtuins)*. Curr Pharm Des, 2008. **14** (6): S. 562-73.
94. TRAPP, J., JOCHUM, A., MEIER, R., SAUNDERS, L., MARSHALL, B., KUNICK, C., VERDIN, E., GOEKJIAN, P., SIPPL, W., JUNG, M., *Adenosine mimetics as inhibitors of NAD+-dependent histone deacetylases, from kinase to sirtuin inhibition*. J Med Chem, 2006. **49** (25): S. 7307-16.
95. 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, 2006. **16** (14): S. 3651-6.
96. 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** (7): S. 2153-6.
97. HUHTINIEMI, T., SUURONEN, T., LAHTELA-KAKKONEN, M., BRUIJN, T., JAASKELAINEN, S., POSO, A., SALMINEN, A., LEPPANEN, J., JARHO, E., *N(epsilon)-Modified lysine containing inhibitors for SIRT1 and SIRT2.* Bioorg Med Chem, 2010. **18** (15): S. 5616-25.
98. SUZUKI, T., ASABA, T., IMAI, E., TSUMOTO, H., NAKAGAWA, H., MIYATA, N., *Identification of a cell-active non-peptide sirtuin inhibitor containing N-thioacetyl lysine.* Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19** (19): S. 5670-2.
99. 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): S. 844-55.
100. MAI, A., MASSA, S., LAVU, S., PEZZI, R., SIMEONI, S., RAGNO, R., MARIOTTI, F.R., CHIARI, F., CAMILLONI, G., SINCLAIR, D.A., *Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors.* J Med Chem, 2005. **48** (24): S. 7789-95.
101. HELTWEG, B., GATBONTON, 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): S. 4368-77.
102. LARA, E., MAI, A., CALVANESE, V., ALTUCCI, L., LOPEZ-NIEVA, P., MARTINEZ-CHANTAR, M.L., VARELA-REY, M., ROTILI, D., NEBBIOSO, A., ROPER, 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): S. 781-91.
103. VILLALBA, J.M., ALCAIN, F.J., *Sirtuin activators and inhibitors.* Biofactors, 2012. **38** (5): S. 349-59.
104. 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): S. 38837-43.

105. NEUGEBAUER, R.C., UCHIECHOWSKA, U., MEIER, R., HRUBY, H., VALKOV, V., VERDIN, E., SIPPL, W., JUNG, M., *Structure-activity studies on splitomicin derivatives as sirtuin inhibitors and computational prediction of binding mode*. J Med Chem, 2008. **51** (5): S. 1203-13.
106. MEDDA, F., RUSSELL, R.J., HIGGINS, M., MCCARTHY, A.R., CAMPBELL, J., SLAWIN, A.M., LANE, D.P., LAIN, S., WESTWOOD, N.J., *Novel cambinol analogs as sirtuin inhibitors: synthesis, biological evaluation, and rationalization of activity*. J Med Chem, 2009. **52** (9): S. 2673-82.
107. 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): S. 8045-54.
108. TRAPP, J., MEIER, R., HONGWISSET, D., KASSACK, M.U., SIPPL, W., JUNG, M., *Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases (sirtuins)*. ChemMedChem, 2007. **2** (10): S. 1419-31.
109. SCHUETZ, A., MIN, J., ANTOSHENKO, T., WANG, C.L., ALLALI-HASSANI, A., DONG, A., LOPPNAU, P., VEDADI, M., BOCHKAREV, A., STERNGLANZ, R., PLOTNIKOV, A.N., *Structural basis of inhibition of the human NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT5 by suramin*. Structure, 2007. **15** (3): S. 377-89.
110. LAIN, S., HOLLICK, J.J., CAMPBELL, J., STAPLES, O.D., HIGGINS, M., AOUBALA, M., MCCARTHY, A., APPELYARD, V., MURRAY, K.E., BAKER, L., THOMPSON, A., MATHERS, J., HOLLAND, S.J., STARK, M.J., PASS, G., WOODS, J., LANE, D.P., WESTWOOD, N.J., *Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator*. Cancer Cell, 2008. **13** (5): S. 454-63.
111. GEY, C., KYRYLENKO, S., HENNIG, L., NGUYEN, L.H., BUTTNER, A., PHAM, H.D., GIANNIS, A., *Phloroglucinol derivatives guttiferone G, aristoforin, and hyperforin: inhibitors of human sirtuins SIRT1 and SIRT2*. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46** (27): S. 5219-22.
112. CHEN, L., FENG, Y., ZHOU, Y., ZHU, W., SHEN, X., CHEN, K., JIANG, H., LIU, D., *Dual role of Zn<sup>2+</sup> in maintaining structural integrity and suppressing deacetylase activity of SIRT1*. J Inorg Biochem, 2010. **104** (2): S. 180-5.

113. SLAMA, J.T., SIMMONS, A.M., *Carbanicotinamide adenine dinucleotide: synthesis and enzymological properties of a carbocyclic analogue of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide*. *Biochemistry*, 1988. **27** (1): S. 183-93.
114. SAUVE, A.A., MOIR, R.D., SCHRAMM, V.L., WILLIS, I.M., *Chemical activation of Sir2-dependent silencing by relief of nicotinamide inhibition*. *Mol Cell*, 2005. **17** (4): S. 595-601.
115. 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): S. 191-6.
116. MILNE, J.C., LAMBERT, P.D., SCHENK, S., CARNEY, D.P., SMITH, J.J., GAGNE, D.J., JIN, L., BOSS, O., PERNI, R.B., VU, C.B., BEMIS, J.E., XIE, R., DISCH, J.S., NG, P.Y., NUNES, J.J., LYNCH, A.V., YANG, H., GALONEK, H., ISRAELIAN, K., CHOY, W., IFFLAND, A., LAVU, S., MEDVEDIK, O., SINCLAIR, D.A., OLEFSKY, J.M., JIROUSEK, M.R., ELLIOTT, P.J., WESTPHAL, C.H., *Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes*. *Nature*, 2007. **450** (7170): S. 712-6.
117. WEGENER, D., WIRSCHING, F., RIESTER, D., SCHWIENHORST, A., *A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening*. *Chem Biol*, 2003. **10** (1): S. 61-8.
118. BORRA, M.T., SMITH, B.C., DENU, J.M., *Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol*. *J Biol Chem*, 2005. **280** (17): S. 17187-95.
119. KAEBERLEIN, 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): S. 17038-45.
120. PACHOLEC, M., BLEASDALE, J.E., CHRUNYK, 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): S. 8340-51.

121. BEHER, D., WU, J., CUMINE, S., KIM, K.W., LU, S.C., ATANGAN, L., WANG, M., *Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74** (6): S. 619-24.
122. CHUNG, J.H., MANGANIELLO, V., DYCK, J.R., *Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications*. Trends Cell Biol, 2012. **22** (10): S. 546-54.
123. WOOD, J.G., ROGINA, B., LAVU, S., HOWITZ, K., HELFAND, S.L., TATAR, M., SINCLAIR, D., *Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans*. Nature, 2004. **430** (7000): S. 686-9.
124. BAUR, J.A., PEARSON, K.J., PRICE, N.L., JAMIESON, H.A., LERIN, C., KALRA, A., PRABHU, V.V., ALLARD, J.S., LOPEZ-LLUCH, G., LEWIS, K., PISTELL, P.J., POOSALA, S., BECKER, K.G., BOSS, O., GWINN, D., WANG, M., RAMASWAMY, S., FISHBEIN, K.W., SPENCER, R.G., LAKATTA, E.G., LE COUTEUR, D., SHAW, R.J., NAVAS, P., PUIGSERVER, P., INGRAM, D.K., DE CABO, R., SINCLAIR, D.A., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444** (7117): S. 337-42.
125. PEARSON, K.J., BAUR, J.A., LEWIS, K.N., PESHKIN, L., PRICE, N.L., LABINSKY, N., SWINDELL, W.R., KAMARA, D., MINOR, R.K., PEREZ, E., JAMIESON, H.A., ZHANG, Y., DUNN, S.R., SHARMA, K., PLESHKO, N., WOOLLETT, L.A., CSISZAR, A., IKENO, Y., LE COUTEUR, D., ELLIOTT, P.J., BECKER, K.G., NAVAS, P., INGRAM, D.K., WOLF, N.S., UNGVARI, Z., SINCLAIR, D.A., DE CABO, R., *Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span*. Cell Metab, 2008. **8** (2): S. 157-68.
126. TIMMERS, S., KONINGS, E., BILET, L., HOUTKOOPER, R.H., VAN DE WEIJER, T., GOOSSENS, G.H., HOEKS, J., VAN DER KRIEKEN, S., RYU, D., KERSTEN, S., MOONEN-KORNIPS, E., HESSELINK, M.K., KUNZ, I., SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B., BLAAK, E.E., AUWERX, J., SCHRAUWEN, P., *Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans*. Cell Metab, 2011. **14** (5): S. 612-22.
127. BASS, T.M., WEINKOVE, D., HOUTHOOFD, K., GEMS, D., PARTRIDGE, L., *Effects of resveratrol on lifespan in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2007. **128** (10): S. 546-52.

128. UM, J.H., PARK, S.J., KANG, H., YANG, S., FORETZ, M., MCBURNEY, M.W., KIM, M.K., VIOLLET, B., CHUNG, J.H., *AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol*. *Diabetes*, 2010. **59** (3): S. 554-63.
129. CANTO, C., GERHART-HINES, Z., FEIGE, J.N., LAGOUGE, M., NORIEGA, L., MILNE, J.C., ELLIOTT, P.J., PUIGSERVER, P., AUWERX, J., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity*. *Nature*, 2009. **458** (7241): S. 1056-60.
130. MINOR, R.K., BAUR, J.A., GOMES, A.P., WARD, T.M., CSISZAR, A., MERCKEN, E.M., ABDELMOHSEN, K., SHIN, Y.K., CANTO, C., SCHEIBYE-KNUDSEN, M., KRAWCZYK, M., IRUSTA, P.M., MARTIN-MONTALVO, A., HUBBARD, B.P., ZHANG, Y., LEHRMANN, E., WHITE, A.A., PRICE, N.L., SWINDELL, W.R., PEARSON, K.J., BECKER, K.G., BOHR, V.A., GOROSPE, M., EGAN, J.M., TALAN, M.I., AUWERX, J., WESTPHAL, C.H., ELLIS, J.L., UNGVARI, Z., VLASUK, G.P., ELLIOTT, P.J., SINCLAIR, D.A., DE CABO, R., *SIRT1720 improves survival and healthspan of obese mice*. *Sci Rep*, 2011. **1**: S. 70.
131. MAYR, L.M., BOJANIC, D., *Novel trends in high-throughput screening*. *Curr Opin Pharmacol*, 2009. **9** (5): S. 580-8.
132. HONG, J., *Role of natural product diversity in chemical biology*. *Curr Opin Chem Biol*, 2011. **15** (3): S. 350-4.
133. LI, J.W., VEDERAS, J.C., *Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?* *Science*, 2009. **325** (5937): S. 161-5.
134. LAM, K.S., *New aspects of natural products in drug discovery*. *Trends Microbiol*, 2007. **15** (6): S. 279-89.
135. LANDRO, J.A., TAYLOR, I.C., STIRTAN, W.G., OSTERMAN, D.G., KRISTIE, J., HUNNICUTT, E.J., RAE, P.M., SWEETNAM, P.M., *HTS in the new millennium: the role of pharmacology and flexibility*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2000. **44** (1): S. 273-89.
136. THORNE, N., AULD, D.S., INGLESE, J., *Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference*. *Curr Opin Chem Biol*, 2010. **14** (3): S. 315-24.
137. FAN, F., WOOD, K.V., *Bioluminescent assays for high-throughput screening*. *Assay Drug Dev Technol*, 2007. **5** (1): S. 127-36.

138. 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*, 2008. **378** (1): S. 53-9.
139. KARAS, M., HILLENKAMP, F., *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Anal Chem*, 1988. **60** (20): S. 2299-301.
140. *Massenspektrometrie*, in *Bioanalytik*, JOACHIM W. ENGELS FRIEDRICH LOTTSPEICH, Herausgeber. 2009, Springer Akademischer Verlag: Heidelberg.
141. SAUER, S., *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Principles and Applications in Life Sciences*, in *Lasers in Chemistry*, MAXIMILIAN LACKNER, Herausgeber. 2008, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. S. 593-616.
142. KARAS, M., BACHMANN, D., HILLENKAMP, F., *Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules*. *Anal Chem*, 1985. **57** (14): S. 2935-2939.
143. CANAS, B., LOPEZ-FERRER, D., RAMOS-FERNANDEZ, A., CAMAFEITA, E., CALVO, E., *Mass spectrometry technologies for proteomics*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2006. **4** (4): S. 295-320.
144. FENN, J.B., MANN, M., MENG, C.K., WONG, S.F., WHITEHOUSE, C.M., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science*, 1989. **246** (4926): S. 64-71.
145. DUNCAN, M.W., RODER, H., HUNSUCKER, S.W., *Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2008. **7** (5): S. 355-70.
146. THOLEY, A., HEINZLE, E., *Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives*. *Anal Bioanal Chem*, 2006. **386** (1): S. 24-37.
147. COHEN, S.L., CHAIT, B.T., *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. *Anal Chem*, 1996. **68** (1): S. 31-7.
148. FENYO, D., WANG, Q., DEGRASSE, J.A., PADOVAN, J.C., CADENE, M., CHAIT, B.T., *MALDI sample preparation: the ultra thin layer method*. *J Vis Exp*, 2007 (3): S. 192.

149. 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, 1999. **4** (2): S. 67-73.
150. SACHS, L., *Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden*. Vol. 11. überarbeitete und aktualisierte Auflage. 2004 (2003), Berlin: Springer.
151. WU, G., YUAN, Y., HODGE, C.N., *Determining appropriate substrate conversion for enzymatic assays in high-throughput screening*. J Biomol Screen, 2003. **8** (6): S. 694-700.
152. COLLART, M.A., BAEUERLE, P., VASSALLI, P., *Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1990. **10** (4): S. 1498-506.
153. NAYAGAM, V.M., WANG, X., TAN, Y.C., POULSEN, A., GOH, K.C., NG, T., WANG, H., SONG, H.Y., NI, B., ENTZEROTH, M., STUNKEL, W., *SIRT1 modulating compounds from high-throughput screening as anti-inflammatory and insulin-sensitizing agents*. J Biomol Screen, 2006. **11** (8): S. 959-67.
154. BISSWANGER, H., *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*. Vol. 3. völlig neu bearbeitete Auflage. 2000, Weinheim [u. a.]: WILEY-VCH.
155. SHARMA, S., MISRA, C.S., ARUMUGAM, S., ROY, S., SHAH, V., DAVIS, J.A., SHIRUMALLA, R.K., RAY, A., *Antidiabetic activity of resveratrol, a known SIRT1 activator in a genetic model for type-2 diabetes*. Phytother Res, 2011. **25** (1): S. 67-73.
156. 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): S. 28-38.
157. ITO, A., LAI, C.H., ZHAO, X., SAITO, S., HAMILTON, M.H., APPELLA, E., YAO, T.P., *p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2*. EMBO J, 2001. **20** (6): S. 1331-40.
158. ELZI, D.J., SONG, M., HAKALA, K., WEINTRAUB, S.T., SHIIO, Y., *Wnt antagonist SFRP1 functions as a secreted mediator of senescence*. Mol Cell Biol, 2012. **32** (21): S. 4388-99.

159. JEON, S.J., SEO, J.E., YANG, S.I., CHOI, J.W., WELLS, D., SHIN, C.Y., KO, K.H., *Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by modulating PI3K-Akt phosphorylation cascades*. J Biomed Sci, 2011. **18**: S. 17.
160. LIN, M.Z., MARZEC, K.A., MARTIN, J.L., BAXTER, R.C., *The role of insulin-like growth factor binding protein-3 in the breast cancer cell response to DNA-damaging agents*. Oncogene, 2012.
161. YANG, N.C., LEE, C.H., SONG, T.Y., *Evaluation of resveratrol oxidation in vitro and the crucial role of bicarbonate ions*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74** (1): S. 63-8.
162. LONG, L.H., CLEMENT, M.V., HALLIWELL, B., *Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273** (1): S. 50-3.
163. CADENE, M., CHAIT, B.T., *A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins*. Anal Chem, 2000. **72** (22): S. 5655-8.
164. TOH-BOYO, G.M., WULFF, S.S., BASILE, F., *Comparison of sample preparation methods and evaluation of intra- and intersample reproducibility in bacteria MALDI-MS profiling*. Anal Chem, 2012. **84** (22): S. 9971-80.
165. GERBER, S.A., RUSH, J., STEMMAN, O., KIRSCHNER, M.W., GYGI, S.P., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100** (12): S. 6940-5.
166. HSU, J.L., HUANG, S.Y., CHOW, N.H., CHEN, S.H., *Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics*. Anal Chem, 2003. **75** (24): S. 6843-52.
167. MATSUMOTO, H., KAHN, E.S., KOMORI, N., *Nonradioactive phosphopeptide assay by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: application to calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. Anal Biochem, 1998. **260** (2): S. 188-94.
168. TOST, J., SCHATZ, P., SCHUSTER, M., BERLIN, K., GUT, I.G., *Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry*. Nucleic Acids Res, 2003. **31** (9): S. e50.
169. 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): S. e49761.
170. JUNG, S.Y., LI, Y., WANG, Y., CHEN, Y., ZHAO, Y., QIN, J., *Complications in the assignment of 14 and 28 Da mass shift detected by mass spectrometry as in vivo methylation from endogenous proteins*. Anal Chem, 2008. **80** (5): S. 1721-9.
171. BONENFANT, D., SCHMELZLE, T., JACINTO, E., CRESPO, J.L., MINI, T., HALL, M.N., JENOE, P., *Quantitation of changes in protein phosphorylation: A simple method based on stable isotope labeling and mass spectrometry*. PNAS, 2003. **100** (3): S. 880-885.
172. MIURA, Y.H., TOMITA, I., WATANABE, T., HIRAYAMA, T., FUKUI, S., *Active oxygens generation by flavonoids*. Biol Pharm Bull, 1998. **21** (2): S. 93-6.
173. MOCHIZUKI, M., YAMAZAKI, S., KANO, K., IKEDA, T., *Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1569** (1-3): S. 35-44.
174. MUNOZ-MUNOZ, J.L., GARCIA-MOLINA, F., MOLINA-ALARCON, M., TUDELA, J., GARCIA-CANOVAS, F., RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N., *Kinetic characterization of the enzymatic and chemical oxidation of the catechins in green tea*. J Agric Food Chem, 2008. **56** (19): S. 9215-24.
175. DE BOER, V.C., DE GOFFAU, M.C., ARTS, I.C., HOLLMAN, P.C., KEIJER, J., *SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism*. Mech Ageing Dev, 2006. **127** (7): S. 618-27.
176. FENG, Y., WU, J., CHEN, L., LUO, C., SHEN, X., CHEN, K., JIANG, H., LIU, D., *A fluorometric assay of SIRT1 deacetylation activity through quantification of nicotinamide adenine dinucleotide*. Anal Biochem, 2009. **395** (2): S. 205-10.
177. CHEN, Z.-Y., ZHU, Q.Y., WONG, Y.F., ZHANG, Z., CHUNG, H.Y., *Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Green Tea Catechins*. J Agric Food Chem, 1998. **46**: S. 2512-2516.
178. AKAGAWA, M., SHIGEMITSU, T., SUYAMA, K., *Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions*. Biosci Biotechnol Biochem, 2003. **67** (12): S. 2632-40.
179. BAE, M.J., ISHII, T., MINODA, K., KAWADA, Y., ICHIKAWA, T., MORI, T., KAMIHIRA, M., NAKAYAMA, T., *Albumin stabilizes (-)-epigallocatechin gallate*

- in human serum: binding capacity and antioxidant property.* Mol Nutr Food Res, 2009. **53** (6): S. 709-15.
180. BOURASSA, P., KANAKIS, C.D., TARANTILIS, P., POLLISSIOU, M.G., TAJMIR-RIAAHI, H.A., *Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin.* J Phys Chem B, 2010. **114** (9): S. 3348-54.
181. BRUNELLE, J.K., ZHANG, B., *Apoptosis assays for quantifying the bioactivity of anticancer drug products.* Drug Resistance Updates, 2010. **13**: S. 172-179.
182. LEE, T.K., LAU, T.C., NG, I.O., *Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines.* Cancer Chemother Pharmacol, 2002. **49** (1): S. 78-86.
183. APPELLA, E., ANDERSON, C.W., *Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses.* Eur J Biochem, 2001. **268** (10): S. 2764-72.
184. SAKAGUCHI, K., HERRERA, J.E., SAITO, S., MIKI, T., BUSTIN, M., VASSILEV, A., ANDERSON, C.W., APPELLA, E., *DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade.* Genes Dev, 1998. **12** (18): S. 2831-41.
185. ROBERS, M.B., LOH, C., CARLSON, C.B., YANG, H., FREY, E.A., HERMANSON, S.B., BI, K., *Measurement of the cellular deacetylase activity of SIRT1 on p53 via LanthaScreen(R) technology.* Mol Biosyst, 2011. **7** (1): S. 59-66.
186. GU, B., ZHU, W.G., *Surf the post-translational modification network of p53 regulation.* Int J Biol Sci, 2012. **8** (5): S. 672-84.
187. YOSHIZAKI, T., SCHENK, S., IMAMURA, T., BABENDURE, J.L., SONODA, N., BAE, E.J., OH, D.Y., LU, M., MILNE, J.C., WESTPHAL, C., BANDYOPADHYAY, G., OLEFSKY, J.M., *SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298** (3): S. E419-28.
188. BALASUBRAMANYAM, K., ALTAF, M., VARIER, R.A., SWAMINATHAN, V., RAVINDRAN, A., SADHALE, P.P., KUNDU, T.K., *Polysisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression.* J Biol Chem, 2004. **279** (32): S. 33716-26.

189. BALASUBRAMANYAM, K., SWAMINATHAN, V., RANGANATHAN, A., KUNDU, T.K., *Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300*. J Biol Chem, 2003. **278** (21): S. 19134-40.
190. CHEN, L.F., MU, Y., GREENE, W.C., *Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB*. EMBO J, 2002. **21** (23): S. 6539-48.
191. BUERKI, C., ROTHGIESSER, K.M., VALOVKA, T., OWEN, H.R., REHRAUER, H., FEY, M., LANE, W.S., HOTTIGER, M.O., *Functional relevance of novel p300-mediated lysine 314 and 315 acetylation of RelA/p65*. Nucleic Acids Res, 2008. **36** (5): S. 1665-80.
192. YANG, H., ZHANG, W., PAN, H., FELDSER, H.G., LAINEZ, E., MILLER, C., LEUNG, S., ZHONG, Z., ZHAO, H., SWEITZER, S., CONSIDINE, T., RIERA, T., SURI, V., WHITE, B., ELLIS, J.L., VLASUK, G.P., LOH, C., *SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF-kappaB activity*. PLoS One, 2012. **7** (9): S. e46364.
193. HUBER, J.L., MCBURNEY, M.W., DISTEFANO, P.S., McDONAGH, T., *SIRT1-independent mechanisms of the putative sirtuin enzyme activators SRT1720 and SRT2183*. Future Med Chem, 2010. **2** (12): S. 1751-9.

## 9 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den folgenden Zeitschriften veröffentlicht:

HOLZHAUSER, S., FREIWALD, A., WEISE, C., MULTHAUP, G., HAN, C.-T., SAUER, S., *Discovery and Characterization of Protein-Modifying Natural Products by MALDI Mass Spectrometry Reveal Potent SIRT1 and p300 Inhibitors*. *Angew Chem Int Ed*, 2013. doi: 10.1002/anie.201207325.

HOLZHAUSER, S., FREIWALD, A., WEISE, C., MULTHAUP, G., HAN, C.-T., SAUER, S., *Screening und Charakterisierung von Protein-modifizierenden Naturstoffen durch MALDI-Massenspektrometrie bringen starke SIRT1- und p300-Inhibitoren hervor*. *Angew Chem*, 2013. doi: 10.1002/ange.201207325.

Patentantrag (EP13153142.8):

Foam cell specific Liver X Receptor (LXR) alpha agonist, SIRT1 inhibitors as well as p300 inhibitors as pharmaceutically active agents

(eingereicht am 29.01.2013 beim Europäischen Patentamt)

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

Ac	<b>Acetylierung</b>
ACN	<b>Acetonitril</b>
ADP	<b>Adenosindiphosphat</b>
AFU	<i>arbitrary fluorescence units</i> (willkürliche Fluoreszenzeinheiten)
AK	<b>Antikörper</b>
AMC	<b>4-Amino-7-methylcoumarin</b>
AMP	<b>Adenosinmonophosphat</b>
AMPK	<b>AMP-aktivierte Proteinkinase</b>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AQUA	<b>Absolute Quantifizierung</b>
AROS	<i>active regulator of SIRT1</i>
AS	<b>Aminosäure</b>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>
AVG	<i>average</i> (Durchschnitt)
BCL6	<b>B-cell CLL/lymphoma 6</b>
BSA	<b>bovines Serumalbumin</b>
CBP	<b>CREB-Bindungsprotein</b>
CC	<i>calibration curve</i> (Kalibrationskurve)
<i>C. elegans</i>	<b><i>Caenorhabditis elegans</i></b>
CHCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> (α-Cyano-4-hydroxizimtsäure)
ChREBP	<i>carbohydrate response-element-binding protein</i> (Kohlenhydrat Response-Element Bindungsprotein)
CoA	<b>Coenzym A</b>
CREB	<b>cAMP Response-Element Bindungsprotein</b>
CRTC2	<b>CREB regulierter transkriptionaler Coaktivator 2</b>
Da	<b>Dalton</b>
DBC1	<i>deleted in breast cancer 1</i>

Deac	<b>Deacetylierung</b>
DHB	2,5- <b>Dihydroxybenzoesäure</b>
<i>D. melanogaster</i>	<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>
DMEM	<b><i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i></b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA	<b><i>deoxyribonucleic acid</i></b> (Desoxyribonucleinsäure)
DSMZ	<b>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</b>
DTT	1,4- <b>Dithiothreit</b>
DYRK	<b><i>dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase</i></b>
€	<b>Euro</b>
EC <sub>50</sub>	Konzentration einer Substanz bei halbmaximaler Aktivierung
ECG	<b>Epicatechingallat</b>
ECL	<b><i>enhanced chemiluminescence</i></b> (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>
EGCG	<b>Epigallocatechingallat</b>
ELISA	<b><i>enzyme-linked immunosorbent assay</i></b>
ESA	<b><i>essential for SIRT1 activity</i></b>
ESI	<b>Elektrospray-Ionisation</b>
et al.	<b><i>et alii</i></b> (und andere)
Eto	<b>Etoposid</b>
FA	<b><i>formic acid</i></b> (Ameisensäure)
FBS	<b>fötales bovines Serum</b>
FdL	<b><i>Fluor-de-Lys</i></b> (Bezeichnung einer Methode)
FL	<b><i>full length</i></b> (volle Länge)
FOXO	<b><i>forkhead box, sub-group O</i></b>
Gcn5	<b><i>general control nonrepressed 5</i></b>
GNAT	<b><i>Gcn5-related N-acetyltransferases</i></b> (Gcn5-verwandte N-Acetyltransferasen)
HAT	<b>Histonacetyltransferase</b>
HB	<b><i>HAT reaction buffer</i></b> (HAT-Reaktionspuffer)
HDAC	<b>Histondeacetylase</b>
HLB	<b><i>hydrophilic-lipophilic-balanced</i></b>
HEPES	4-(2- <b>Hydroxyethyl</b> )- <b>piperazinyl</b> - <b>ethansulfonsäure</b>
HPA	3- <b>hydroxypicolinic acid</b> (3-Hydroxypicolinsäure)

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HTS	<i>high-throughput screening</i> (Hochdurchsatz-Screening)
IC <sub>50</sub>	Konzentration einer Substanz bei halbmaximaler Inhibition
IgG	<b>Immunglobulin G</b>
INAM	<b>Isonicotinamid</b>
JNK1	<b>cJUN N-terminale Kinase 1</b>
K <sub>d</sub>	<b>Dissoziationskonstante</b>
K <sub>m</sub>	<b>Michaelis-Konstante</b>
ln	natürlicher <b>Logarithmus</b>
log	dekadischer <b>Logarithmus</b>
LPS	<b>Lipopolysaccharid</b>
LXR	<b>Leber-X-Rezeptor</b>
Lys	<b>Lysin</b>
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MAO-A	<b>Monoaminoxidase A</b>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (Brustkrebszelllinie)
MOPS	3-(N- <b>Morpholino</b> )- <b>Propansulfonsäure</b>
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Ribonucleinsäure-Transkript)
MS	<b>Massenspektrometrie</b>
MW	<b>Mittelwert</b>
MYST	HAT-Familie, bestehend aus <b>MOZ</b> , <b>Ybf2/Sas3</b> , <b>Sas2</b> , <b>TIP60</b>
m/z	Masse ( <b>m</b> ) -zu-Ladung ( <b>z</b> ) -Verhältnis
NA	<i>nicotinic acid</i> (Nicotinsäure)
NAAD	<i>nicotinic acid adenine dinucleotide</i> (Nicotinsäure-Adenin- Dinucleotid)
NAD	<b>Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid</b>
NAM	<b>Nicotinamid</b>
NAMN	<i>nicotinic acid mononucleotide</i> (Nicotinsäure-Mononucleotid)
NAMPT	<b>Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase</b>
NcoR	nuklearer Rezeptor <b>Corepressor</b>

NFκB	<i>nuclear factor of <b>kappa</b> light polypeptide gene enhancer in <b>B</b> cells</i>
NHLH2	<i>nescient <b>helix-loop-helix 2</b></i>
NMN	<b>Nicotinamid-Mononucleotid</b>
NMR	<i>nuclear <b>magnetic resonance</b> (Kernspinresonanz)</i>
NP	<i>natural <b>product</b> (Naturstoff)</i>
NR	<b>Nicotinamidribosid</b>
n. s.	nicht <b>signifikant</b>
O-AADPR	<b>O-Acetyl-ADP-Ribose</b>
PAGE	<b>Polyacrylamidgelelektrophorese</b>
PARP	<b>Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase</b>
PBEF	<i>pre-<b>B</b> cell colony-<b>enhancing factor</b></i>
PBS	<i>phosphate <b>buffered saline</b> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)</i>
PGC-1α	<b>PPARy Coaktivator-1α</b>
PIC	<b>Protease Inhibitor Cocktail</b>
PNC1	<b>Pyrazinamidase / Nicotinamidase 1</b>
PPARy	<b>Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor y</b>
PTP1B	<b>Protein-Tyrosin Phosphatase 1B</b>
RB	<i>SIRT1 <b>reaction buffer</b> (SIRT1-Reaktionspuffer)</i>
RBC	<i>Reaction <b>Biology Corporation</b></i>
RNA	<i>ribonucleic <b>acid</b> (Ribonucleinsäure)</i>
RPMI	<i>Roswell <b>Park Memorial Institute</b> (Zellkulturmedium)</i>
RSV	<b>Resveratrol</b>
RT	<b>Raumtemperatur</b>
Sas2/3	<i>something <b>about silencing protein 2/3</b></i>
<i>S. cerevisiae</i>	<b>Saccharomyces cerevisiae</b>
SD	<i>standard <b>deviation</b> (Standardabweichung)</i>
SDS	<i>sodium <b>dodecyl sulfate</b> (Natriumdodecylsulfat)</i>
SEM	<i>standard <b>error of the mean</b> (Standardfehler des Mittelwertes)</i>
Ser	<b>Serin</b>
SEV	<b>Sekundärelektronenvervielfacher</b>
Sir2	<i>silent <b>information regulator 2</b></i>
Sir2-Af1/2	<b>Sir2-Homolog in <i>Archaeoglobus fulgidus</i> 1/2</b>
SIRT	<b>Sirtuin</b>

SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors</i>
S/N	<i>signal-to-noise ratio</i> (Signal-Rausch-Verhältnis)
s. o.	siehe <b>oben</b>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TAMRA	<b>Tetramethylrhodamin</b>
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	<i>tris buffered saline with tween</i> (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween)
TF	<b>Transkriptionsfaktor</b>
TFA	<i>trifluoro acetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TIP60	<b>Tat-interagierendes Protein, 60 kDa</b>
Thr	<b>Threonin</b>
TNF $\alpha$	<b>Tumornekrosefaktor <math>\alpha</math></b>
TOF	<i>time-of-flight</i> (Flugzeit)
Trp	<b>Tryptophan</b>
TSA	<b>Trichostatin A</b>
U	<b>Unit</b>
u. a.	<b>unter anderem</b>
UCP2	<i>uncoupling protein 2</i> (Entkopplungsprotein 2)
UTL	<i>ultra-thin layer</i> (Ultradünnschicht)
$v_0$	<i>initial velocity</i> (Anfangsgeschwindigkeit)
vs.	<b>versus</b>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
$V_{\max}$	<i>maximum velocity</i> (maximale Umsatzgeschwindigkeit)
w/v	<i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)
yHst2	Sir2-Homolog in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
z. B.	zum <b>B</b> eispiel

## 10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Altersaufbau der Bevölkerung in Deutschland (aus (1))	1
Abbildung 1-2: Regulation verschiedener Stoffwechselwege durch SIRT1	9
Abbildung 1-3: Struktur von SIRT1	10
Abbildung 1-4: NAD <sup>+</sup> -Bindungstasche, unterteilt in die Taschen A, B und C	11
Abbildung 1-5: SIRT1-vermittelte Deacetylierungsreaktion	12
Abbildung 1-6: Regulation der NAD <sup>+</sup> -Verfügbarkeit einer Zelle	15
Abbildung 1-7: Strukturformeln ausgewählter SIRT1-Inhibitoren	18
Abbildung 1-8: Strukturformeln ausgewählter artifizieller SIRT1-Aktivatoren	20
Abbildung 1-9: Reaktionsprinzip der <i>Fluor-de-Lys</i> -Methode	21
Abbildung 1-10: Bestandteile eines Massenspektrometers	27
Abbildung 3-1: Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Methode	43
Abbildung 3-2: Gruppentest für A) $p = 0,1\%$ und B) $p = 0,2\%$	45
Abbildung 3-3: Reaktionsprinzip der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Detektion	53
Abbildung 3-4: Reaktionsprinzip der Zellproliferationsmessung	55
Abbildung 4-1: Optisches Erscheinungsbild der <i>UTL</i> -Präparation	60
Abbildung 4-2: Einfluss des Mischens von Probe und Probenmatrix vor der Präparation auf die MALDI-TOF MS Detektion	61
Abbildung 4-3: Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf das mittels MALDI- TOF MS detektierte Peptidverhältnis	62
Abbildung 4-4: Kalibrationskurven unterschiedlicher Peptide	63
Abbildung 4-5: Einfluss der Detektierbarkeit eines Peptides auf das Auftreten von Hintergrundsignalen	65
Abbildung 4-6: Überprüfung der SIRT1-Aktivierung durch RSV und SRT1720 mittels <i>FdL</i> -Methode	66
Abbildung 4-7: Überprüfung der SIRT1-Aktivierung durch RSV und SRT1720 mit Peptiden ohne Fluoreszenzmarkierung mittels MALDI-TOF MS- basierter Methode	67
Abbildung 4-8: Überprüfung der SIRT1-Aktivierung durch RSV und SRT1720 mit fluoreszenzmarkierten Peptiden mittels MALDI-TOF MS-basierter Methode	68
Abbildung 4-9: $K_m$ -Wert-Bestimmung des Histon H4-Peptides zu SIRT1	69
Abbildung 4-10: Bestimmung von SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für das Histon H4-Peptid	71
Abbildung 4-11: Bestimmung von SIRT1-Konzentration und Reaktionszeit für das AMC-Peptid	72
Abbildung 4-12: Bestimmung des $Z'$ -Faktors für das Histon H4-Peptid	73

Abbildung 4-13: Bestimmung des Z'-Faktors für das AMC-Peptid _____	74
Abbildung 4-14: Detektion des SIRT1-Inhibitors Suramin aus Substanzpools unterschiedlicher Größe mittels MALDI-TOF MS _____	75
Abbildung 4-15: Detektion des artifiziellen SIRT1-Aktivators RSV aus Substanzpools unterschiedlicher Größe mittels MALDI-TOF MS _____	76
Abbildung 4-16: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurven zur Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte der SIRT1-Inhibitoren Suramin und EX-527 _____	77
Abbildung 4-17: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurve zur Bestimmung des EC <sub>50</sub> -Wertes des artifiziellen SIRT1-Aktivators RSV _____	78
Abbildung 4-18: Bestimmung der cytotoxischen Effekte der SIRT1-Inhibitoren NP 1-8 im HepG2-Zellmodell _____	82
Abbildung 4-19: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurven zur Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte der SIRT1-inhibierenden Screeninghits _____	83
Abbildung 4-20: Bestimmung der cytotoxischen Effekte des Cytostatikums Etoposid im HepG2-Zellmodell _____	84
Abbildung 4-21: Detektion der p53-Acetylierung in der cytosolischen Fraktion von HepG2-Zellen nach Behandlung mit NP1 _____	85
Abbildung 4-22: Detektion der p53-Acetylierung in der nucleären Fraktion von HepG2-Zellen nach Behandlung mit NP1 _____	86
Abbildung 4-23: Bestimmung der cytotoxischen Effekte des artifiziellen, SIRT1 aktivierenden Screeninghits NP9 im HepG2-Zellmodell _____	87
Abbildung 4-24: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurve zur Bestimmung des EC <sub>50</sub> -Wertes des artifiziellen, SIRT1 aktivierenden Screeninghits NP9 _____	88
Abbildung 4-25: Detektion des Einflusses von NP9 auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Sekretion durch THP-1-Zellen _____	89
Abbildung 4-26: Chemische Strukturen der artifiziellen SIRT1-Aktivatoren RSV, Quercetin und NP9 _____	90
Abbildung 4-27: Einfluss von HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> auf die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Generierung durch RSV und NP9 _____	91
Abbildung 4-28: Einfluss von HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> auf die Integrität von RSV und NP9 _____	92
Abbildung 4-29: Bestimmung von p300-Konzentration und Reaktionszeit für das HAT-Peptid _____	93
Abbildung 4-30: Mittels MALDI-TOF MS generierte Kurve zur Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes des p300-Inhibitors NP9 _____	94
Abbildung 4-31: Mittels einer radioaktivitätsbasierten Methode generierte Kurve zur Validierung des IC <sub>50</sub> -Wertes des p300-Inhibitors NP9 _____	95
Abbildung 5-1: Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Detektion von Acetylierungs- und Deacetylierungsreaktionen _____	108
Abbildung 5-2: Strukturvergleich der artifiziellen SIRT1-Aktivatoren RSV, Piceatannol, Quercetin und NP9 _____	111

### 10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Phylogenetische, funktionale und lokale Einteilung der Sirtuine (nach (33))	6
Tabelle 1-2: EC <sub>50</sub> -Werte und maximale Aktivierung bekannter SIRT1-Aktivatoren (nach (116))	20
Tabelle 1-3: Strukturen, Anwendungsgebiete und geeignete Laserwellenlängen verbreiteter MALDI-Matrices (nach (141))	28
Tabelle 3-1: IC <sub>50</sub> '-/EC <sub>50</sub> '-Wert Korrektur (basierend auf (151))	51
Tabelle 3-2: Übersicht über die verschiedenen Antikörper- (AK-) Lösungen und Verdünnungen	57
Tabelle 4-1: Validierung der mittels MALDI-TOF MS detektierten IC <sub>50</sub> - bzw. EC <sub>50</sub> -Werte mit ESI MS und Vergleich mit Literaturwerten	78
Tabelle 4-2: Screeninghits für SIRT1-Inhibitoren	79
Tabelle 4-3: Screeninghit für artifizielle SIRT1-Aktivatoren	80