

University of Groningen

Chemistry-based enzyme detection and inhibition in epigenetics

Ourailidou, Maria-Eleni

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Ourailidou, M-E. (2016). *Chemistry-based enzyme detection and inhibition in epigenetics*. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Appendix

Samenvatting en toekomstperspectief

Acknowledgements

Curriculum Vitae

List of publications

Samenvatting en toekomstperspectief

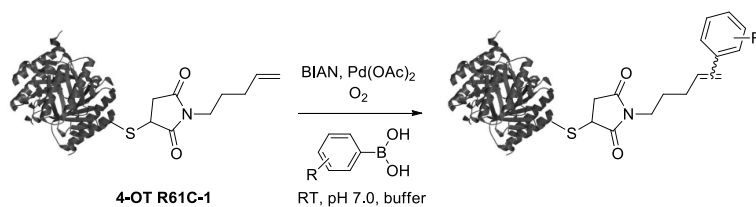
In dit proefschrift wordt de ontwikkeling van nieuwe diagnostische hulpmiddelen beschreven met als doel om endogene post-translationele eiwitmodificaties op te sporen en om de activiteit van chromatine modifierende enzymen te onderzoeken. Het uiteindelijke doel is om een bijdrage te leveren aan het ophelderen van de rol van deze enzymen ziekteprocessen.

Oxidatieve Heck reactie als bioorthogonale eiwitlabeling strategie

De huidige methoden om enzymactiviteit te detecteren hebben ernstige tekortkomingen hetgeen hun toepassingen gering maakt. De op antilichamen gebaseerde technieken brengen bijvoorbeeld hoge kosten met zich mee en zijn weinig specifiek, terwijl analytische strategieën (o.a. NMR spectroscopie en massa spectrometrie) ofwel ineffectief zijn in complexe eiwitmengsels ofwel veel analysetijd vragen. Uitbreidingen in het veld van de chemische biologie hebben tot een overvloed aan nieuwe bioorthogonale chemische reacties geleid die gebruikt kunnen worden om enzymactiviteit *in vitro* te meten.

Met chemisch labelen wordt het koppelen van reactieve functionaliteiten aan biomoleculen bedoeld, die vervolgens gevisualiseerd kunnen worden middels bioorthogonale koppeling van een detecteerbaar molecuul. In combinatie met metabole labeling, waarin gefunctionaliseerde analogen van natuurlijke enzymsubstraten enzymatisch worden ingebouwd in het eiwit van interesse, zijn scheikundige methoden krachtig gebleken in het bestuderen van een verscheidenheid aan endogene eiwitmodificaties. De populairste bioorthogonale reactie is de kopergekatalyseerde Huisgen cycloadditie, beter bekend als de 'click' reactie, waarmee azides worden gekoppeld aan alkynen. Ondanks de mogelijkheden die azides en alkynen bieden als chemische handvaten, brengen de polariteit van azides en de mogelijkheid tot intracellulaire kruisreactiviteit van eindstandige alkynen, vanwege hun zure proton, problemen met zich mee. Eindstandige alkenen daarentegen, zijn voordelig door hun grote gelijkheid met alkanen en hun lagere reactiviteit en vertegenwoordigen daardoor een aantrekkelijke groep moleculen.

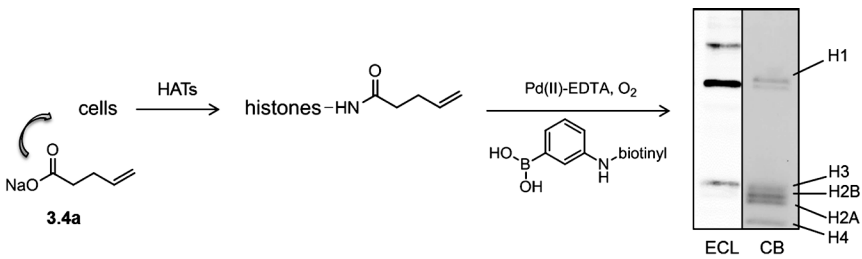
In **hoofdstuk 2** beschrijven we de ontwikkeling van de oxidatieve Heck reactie als een nieuwe bioorthogonale reactie om alkeen-gelabelde eiwitten *in vitro* te detecteren. Voordat daadwerkelijke applicaties worden behandeld, beginnen we met het verkennen en optimaliseren van de verschillende facetten van de reactie met een model eiwit. We kozen voor een 4-oxalocrotonaat tautomerase mutant waarin het voorlaatste aminozuur vervangen is door een cysteïne, zodat daaropvolgende Michael additie met een maleimide-gebonden eindstandige alkeen plaats kon vinden. Het katalysesysteem bestond uit Pd(OAc)₂ en het ligand BIAN (de bis-imine van acenaphthenequinon en mesitylamine) en werd gemaakt in dimethylformamide (DMF). Verschillend gesubstitueerde arylboorzuren werden gebruikt als koppelingpartners (schema 1). De reacties vonden plaats over een tijd van 24 uur bij kamertemperatuur, onder invloed van zuurstof en in



Schema 1. Oxidatieve Heck reacties met eiwitgebonden alkeen 4-OT R61C-1.

een waterig mengsel van 6:1 buffer/DMF om de reagentia in oplossing te houden. Chelatie van Pd met EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuur) bleek noodzakelijk te zijn om aspecifieke binding van het metaal aan het eiwit tegen te gaan. Met massaspectrometrische analyse toonden we omzetting naar het gewenste gereageerde eiwit aan. Door de hoeveelheid reagentia te variëren kwamen we tot de optimale hoeveelheden van 20 equiv. katalysator en 100 equiv. arylborzuur ten opzichte van het eiwit. Zeer interessant was de observatie dat onder dezelfde omstandigheden omzetting van *cis*-alkenen hoog was, terwijl slechts 5% van de eiwitgebonden *trans*-alkenen reageerden. Dit geeft aan dat er een belangrijk mogelijkheid is voor het gebruik van de oxidatieve Heck reactie in het selectief detecteren van *cis*-onverzadigde vetzuren in het bijzijn van de *trans*-varianten. De oxidatieve Heck reactie is vervolgens gebruikt in gelelektroforese-detectie van 4-OT R61C middels het koppelen van alle beschikbare alkeengroepen aan het fluorescente 3-(dansylamino)fenylborzuur. Eenzelfde koppeling werd uitgevoerd in cellysaat van RAW267.4 macrofagen gemengd met 4-OT R61C-1 in ratio's van 1:1 en 10:1. Tot onze genoegdoening gaven in beide gevallen alleen de eiwitgebonden alkenen een waarneembaar fluorescent signaal af. Deze bevindingen introduceren de oxidatieve Heck reactie als een bruikbare detectiemethode om alkeengelabelde eiwitten efficiënt en selectief te volgen *in vitro*.

In **hoofdstuk 3** vervolgen we onze studie door, in combinatie met metabole labelingtechnieken, de reactie toe te passen in de *in vitro* detectie van histonacetyleringen. Eerst werden hoge omzettingen van 4-OT R61C-1 bereikt in volledig waterige condities met het gebruik van EDTA als ligand voor de katalysator en het wateroplosbare 3-(biotinylamino)fenylborzuur en 3-(dansyl-PEG-amino)fenylborzuur als detectiehandvaten, in de eerder geoptimaliseerde hoeveelheden. In vergelijking tot BIAN en 2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine ontwikkeld door Davis *et al.*, bleek EDTA een efficiëntere ligand te zijn voor Pd(II)-gekatalyseerde bioorthogonale koppelingen. Daarnaast was chelatie van mogelijk aspecifiek eiwitgebonden Pd ook niet meer nodig. Tegengestelde resultaten werden daarentegen verkregen wanneer EDTA gebruikt werd in reacties met niet-eiwitgebonden eindstandige alkenen. Dit is in overeenstemming met gegevens over de wateroplosbaarheid en stabiliteit van EDTA in het bijzijn van eiwitten. Overigens bleek een neutrale of licht basische pH het beste te zijn voor de voortgang van de reactie en volledige omzetting werd behaald bij concentraties 4-OT R61C-1 zo laag als 5 μM . Bij lagere concentraties daalde de efficiency van zowel de oxidatieve Heck als de 'click' reactie.



Figuur 1. Metabole labeling met alkenen, biotinylatie en *in vitro* detectie van histoneacetylatie *via* de oxidatieve Heck reactie. ECL; chemiluminescentie test voor western blot detectie, CB; coomassie blauwkleuring.

Om histonacetyleringen *in vitro* te meten gebruikten we 3-alkeen carboxylaat, natrium 4-pentenoaat **3.4a** en de corresponderende thio- en methyl ester derivaten voor het enzymatisch inbouwen van alkenen in histonen *via* histone acetyltransferases (HATs). Behandeling van RAW267.4 cellen met 10mM van elke stof voor 6 uur, gevolgd door histonextractie en biotinylatie *via* de oxidatieve Heck reactie resulteerde in efficiënte labeling van histon H3 wanneer stof **3.4a** (Figuur 1) werd gebruikt, terwijl de corresponderende ester slechts weinig werd ingebouwd. Vergelijkbare luminescentie werd waargenomen na incubatie met natrium 4-pentynoaat en een daaropvolgende ‘click’ reactie, maar in dat geval werd histon H4 ook waargenomen, wat erop duidt dat 4-pentynoyl groep beter wordt geïncorporeerd in H4 dan de 4-pentenoyl groep. Tenslotte resulteerde behandeling van cellen met bekende HATr en histon deacetylase remmers (HDACr), en daaropvolgende toediening van **3.4a**, in een reductie van H3 labeling. Er was echter geen effect op het globale lysine acetyleringsniveau zichtbaar met anti-acetyllysine antilichamen. Deze data ondersteunen het gebruik van een op chemie gebaseerde aanpak van het *in vivo* testen van de effectiviteit van ontwikkelde remmers van ziekte-gerelateerde enzymen.

In **Hoofdstuk 4** geven we een overzicht van de toepassingen van metabole labelingstechnieken en bioorthogonale chemie in de studie van eiwitacyleringen *in vitro*. In het bijzonder benadrukken we de reacties die eindstandige alken- of alkyne-gefunctionaliseerde moleculen gebruiken, die door hun kleine omvang en gemakkelijke cellulaire opname waardevol zijn. Naast hun voordelen bespreken we ook de nadelen van elke reactie om zo tot de meest geschikte bioconjugatie methode te komen. We duiden ook op het belang van *in vivo* metabole enzymen voor het inbouwen van de reactieve moleculen als eerste stap. Dit om posttranslationele veranderingen in het eiwit van interesse te kunnen bestuderen. De tweede stap, bioorthogonale koppeling, kan daarentegen *in vitro* plaats vinden na cellyse en eiwitextractie. Met de nadruk op het bestuderen van eiwitacylatie *in vitro* beschrijven we vervolgens de metabole routes van acyl-CoA om de alkeen- of alkynebevattende acyl-CoA derivaten die hiervoor gebruikt zijn weer te geven. Bovendien presenteren we de resultaten van onze eigen inspanningen om geacyleerde eiwitten te onderzoeken middels alkeen α -keton

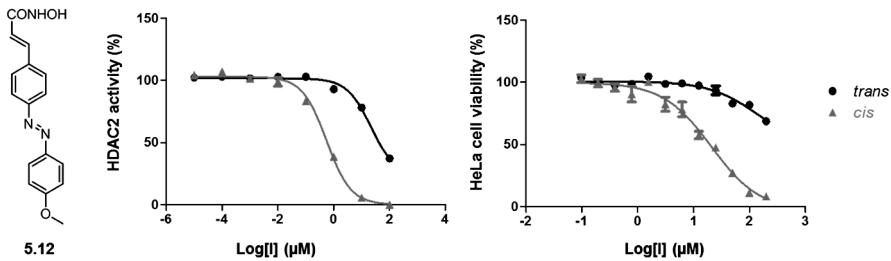
carboxylaten. Biotinylatie *via* de oxidatieve Heck reactie liet in dat geval echter geen labeling zien in cellysaten dan wel geëxtraheerde histonen, waarschijnlijk door competitie van het α -keton carboxylaat met het natuurlijke substraat, en een minder gunstige cellulaire opname. Desondanks het ontegenzeggelijke succes van metabole labelingstrategieën concluderen we ten slotte dat de noodzaak van hoge concentraties onnatuurlijk substraat en/of het gebruik van remmers voor enzymen die het substraat verwijderen het daadwerkelijk fysiologisch beeld van endogene eiwitmodificaties verstoren. Daarom dienen vervolgstudies zich bezig te houden met de ontwikkeling van verbeterde diagnostische testen die niet alleen eiwitmodificaties kunnen identificeren maar ook kunnen kwantificeren om zo een beter beeld van pathologische processen te kunnen verschaffen.

Ons werk rechtvaardigt het gebruik van de oxidatieve Heck reactie als aantrekkelijk alternatief voor de alom gebruikte 'click' reacties, aangezien de efficiëntie vergelijkbaar is. Gezien de succesvolle toepassing van de reactie in de *in vitro* bestudering van eiwitacylatie, en dus endogene HAT activiteit, dient toekomstig onderzoek zich te richten op het detecteren van de activiteit van andere eiwitten geïmpliceerd in ernstige ziektes. Echter, desondanks de efficiency en de chemoselectiviteit van de reactie met eiwitgebonden alkenen, hindert de duur om de koolstof-koolstof binding tot stand te brengen het gebruik in gevallen waar bionconjugatie snel plaats moet vinden. Door de beperkingen van de tot nu toe beschikbare chemische reacties zijn nieuwe biologisch-verenigbare chemische methoden nodig. Enerzijds om enzymfuncties beter te kunnen bestuderen en anderzijds om laagmoleculaire remmers te testen voor therapeutische toepassingen.

Licht-schakelbare HDAC remmers als veelbelovende anti-kanker-middelen

De literatuur ondersteund de belangrijke rol van HDACs in epigenetische regulatie van genexpressie en het verband tussen afwijkende HDAC activiteit en tumorgenese. Een grote verscheidenheid aan HDACr zijn de afgelopen jaren ontdekt, maar slechts een paar zijn goedgekeurd voor klinische toepassingen of worden onderzocht in klinisch onderzoek voor de behandeling van een aantal aandoeningen. Een algemene bijwerking van klassieke chemotherapie is cytotoxiciteit door een gebrek aan selectiviteit van de gebruikte middelen. Dit probleem kan verminderd worden door gebruik te maken van licht-schakelbare geneesmiddelen waarbij extern licht lokale activatie van een geneesmiddel tot gevolg heeft. Hierdoor worden cytotoxische effecten beperkt en zijn hogere geneesmiddelconcentraties mogelijk.

In **hoofdstuk 5** van dit proefschrift presenteren we de ontwikkeling van licht-schakelbare analogen van de klinisch toegepaste, op hydroxzaamzuur-gebaseerde, HDACr vorinostat, panobinostat en belinostat als potentiële chemotherapeutica. We selecteerden de azobenzeengroep als lichtschakelaar en introduceerden deze allereerst in het afsluitende deel van de HDACr en ten tweede in het verbindende deel, tussen de afsluitende groep en de actieve groep. Zowel de *cis*- als de *trans*-isomeren waren toegestaan. In het beste geval is de thermodynamisch stabiele



Figuur 2. Studies naar de prestaties van de fotoschakelbare HDACi **5.12**.

trans-vorm minder doeltreffend dan de *cis*-vorm, zodat onder invloed van UV straling het geneesmiddel kan worden omgezet in de actieve *cis*-vorm. Om dit te bereiken hebben we 12 structuren met verschillende ketenlengtes, substituties en posities van de azobenzeengroep ontworpen en gesynthetiseerd. Fotochemische studies brachten een gunstige fotostationaire toestand (PSS > 76%) aan het licht en van bijna alle structuren had de *cis*-isomeer een halfwaardetijd van meer dan 2 uur in een waterige oplossing.

Alle structuren werden aanvankelijk getest op remming van HDAC activiteit in HeLa nucleaire extracten. De moleculen uit het eerste ontwerp waren doeltreffender dan degenen uit het tweede ontwerp, waarbij de *trans*-isomeren actiever waren van de *cis*-vormen. Daarna werd een selectie gescreend op remming van humane recombinant HDAC1-3, 6 en 8. Met betrekking tot het eerste ontwerp waren *trans*-structuren sterke remmers in het laag-nanomolaire bereik (zelfs 10-maal sterker in vergelijking tot vorinostat), maar er was slechts een klein verschil waarneembaar in de activiteit (zoals weergegeven in de IC₅₀-waarden) tussen *cis*- en *trans*-isomeren. Tot onze genoegdoening was het genoemde verschil significant hoger voor de structuren uit het tweede ontwerp, waarbij *cis*-**5.12** HDAC2 bijna 40 keer sterker remde dan de *trans*-vorm (Figuur 2). Daaropvolgende incubatie van *cis*-**5.12** met HDAC2 en succesvolle *in situ* lichtisomerisatie (met witlicht) resulteerde in een toename van de enzymactiviteit door de vorming van de minder sterk werkende *trans*-variant. Verder leed behandeling van HeLa cellen voor 16 uur met beide isomeren tot een dosisgerelateerde vermindering van de levensvatbaarheid van de cellen in het geval van de *cis*-isomeer, terwijl de *trans*-isomeer een kleine invloed had (Figuur 2). Al met al voldoet **5.12** het meest aan de criteria voor lichtcontroleerbare chemotherapeutica en is het een veelbelovende start voor het toepassen van fotofarmacologie in de behandeling van kanker.

Met deze studies hebben we een *proof of principle* aangetoond voor de ontdekking van aanvullende licht-geactiveerde inhibitoren welke zich richten op eiwitten met een centrale rol in oncogenese en mogelijk verminderen ze het risico op off-target effecten die gebruikelijk zijn bij klassieke chemotherapie. Desondanks is er een noodzaak voor de ontwikkeling van inhibitoren, die geschakeld worden door zichtbaar licht, met een lagere toxiciteit en betere weefsel penetratie. Het uiteindelijke doel is een volledig non-invasieve fotofarmacologie waardoor

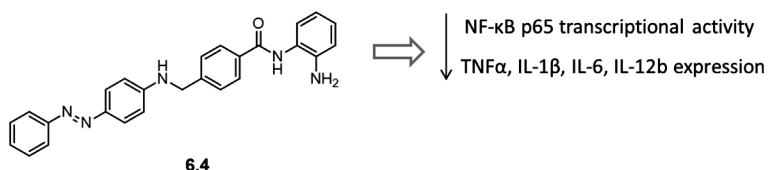
therapeutische toepassingen van zulke moleculen in combinatie met de recente voortgang in tumor beeldvorming veelbelovend zijn.

Ontstekingsremmende effecten van azobenzeen analogen van Entinostat

Naast carcinogenese is het ook aangetoond dat HDACs een rol spelen in de pathogenese van enkele ontstekingsziekten. Naast andere functies heeft de deacetylerende functie op NF- κ B p65 transcriptiefactor ze gekenmerkt als belangrijke regulatoren van NF- κ B overgebrachte ontstekingssignalering. Redelijk veel inspanningen zijn er gedaan die zich richten op HDACs met een rol in ontsteking, maar het merendeel van de HDACi die worden gebruikt in de kliniek hebben een gebrek aan specificiteit. Nog belangrijker zijn de niet-effectieve en verscheidene farmacologische effecten van selectieve HDACi waardoor de ontwikkeling van nieuwe diagnostische gereedschappen die de rol van individuele isovormen in ontstekingsroutes bepalen nodig is.

In **hoofdstuk 6** introduceren we een chemisch epigenetische strategie om sterk lijkende structuur analogen te maken van de klinisch gebruikte potente HDAC1-3 inhibitor Entinostat in een poging de functie van elke isovorm in NF- κ B gemedieerde ontstekings genexpressie in macrofagen te onderzoeken. Drie verbindingen werden ontworpen met een azobenzeen groep in de *para*, *meta* en *ortho* positie ten opzichte van de amine groep in de linker van Entinostat (respectievelijk verbinding **6.4**, **6.7** en **6.9**). Door gebruik te maken van het *trans*-isomeer van elke verbinding in inhibitie en kinetiek studies werd een niet-selectief profiel voor HDAC1-3 inhibitie waargenomen (laag μ M bereik) met de uitzondering van **6.7** welke een K_i van 0.63 μ M heeft voor HDAC1.

Andere farmacologische studies naar LPS/IFN γ gestimuleerde RAW264.7 macrofagen die voorbehandeld werden voor twintig uur met elke inhibitor liet voor de verbindingen **6.4** en **6.9** inhibitie zien van de transcriptionele activiteit en kern translocatie van NF- κ B p65 terwijl **6.7** en de referentie, Entinostat, het tegenovergestelde lieten zien. Vervolgens maten we de expressie niveaus van de pro-inflammatoire genen TNF α , iNOS, IL-1 β , IL-6 en IL-12b en vonden we, los van iNOS waar geen invloed werd waargenomen, dat verbinding **6.4** resulteerde in een dosisafhankelijke reductie van de mRNA expressie van alle andere cytokinen. Analogen **6.7** en **6.9** onderdrukten de expressie van IL-6, maar net als Entinostat veroorzaakten ze upregulatie of hadden ze geen effect op de rest van de genen. Bijzonder is de opmerkelijke reductie van iNOS expressie die met verbinding **6.7** en



Figuur 3. Structuur en ontstekingsremmende effecten van een *para*-gesubstitueerd azobenzeen analoog van Entinostat.

Entinostat werd waargenomen en welke de connectie tussen HDAC1 inhibitie en transcriptionele regulatie van dit gen ondersteunt. Bovendien werd de fenomenale toename van het ontstekingsremmende cytokine IL-10, veroorzaakt door Entinostat, niet waargenomen voor de azobenzeen analogen. Hieruit concluderen we dat kleine veranderingen in de structuur van een inhibitor kan leiden tot een significante verandering in het farmacologisch gedrag en dat complete HDAC1-3 inhibitie gunstig is om het gewenste ontstekingsremmende profiel te verkrijgen.

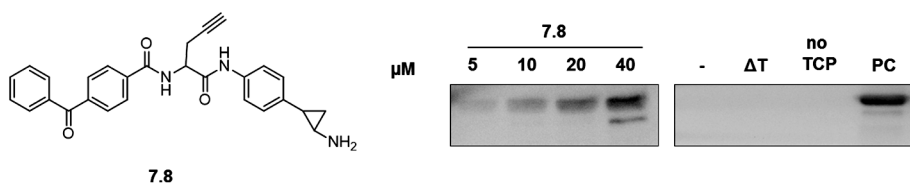
Onze bevindingen ondersteunen de bruikbare vooruitzichten dat chemische epigenetica kunnen bijdragen aan de ontdekking en identificatie van HDACi met ontstekingsremmende karakteristieken. Verder kunnen zulke studies de connectie tussen HDAC activiteit en regulering van NF- κ B signalering bevestigen. Bovendien kan door het ontwerpen van sterke gerelateerd structurele derivaten van klinisch gebruikte medicijnen de weg worden gelegd naar het begrijpen van de rol van isovormen in andere enzymklassen voor verschillende ziektemodellen en *via* deze weg mogelijk leiden tot geconcentreerde therapeutische inspanningen.

Activiteit-gebaseerde moleculaire sonde voor de detectie van LSD1 activiteit

Recente voortgang laat een veelzijdige maar kritische rol van lysine-specifieke demethylase-1 (LSD1) in tumorgenese zien. De effecten van activatie of reductie van genexpressie, afhankelijk van de interactie met andere eiwitten, hebben de interesse van vele onderzoeksgroepen gewekt met als doel de biologische functie van dit enzym en de implicaties in kanker initiatie en progressie op te helderen.

In **hoofdstuk 7**, beschrijven we onze inspanning naar het labelen van menselijk recombinant – en endogeen LSD1 door gebruik te maken van vijf tranlylcypromine (TCP) analogen om een covalente binding aan de cofactor FAD en eiwit gebaseerde eiwit profilering te garanderen. Vier verbindingen bevatten een *para*-benzoylamino groep ten opzichte van de fenyl ring van TCP en werden gefunctionaliseerd met een eindstandig alkyne voor verdere detectie met een klikreactie of met een eindstandig alkeen voor een bioconjugatie met de oxidatieve Heck reactie. Door de non-covalente interacties van LSD1 met de cofactor ontworpen we een moleculaire moleculaire gefunctionaliseerd met een alkyne (verbinding **7.8**) alsmede een benzofenon groep die dient voor fotocrosslinking en irreversibele binding met het enzym. Alle verbinding laten een goede werkzaamheid, snelle binding en tijdsafhankelijk inhibitie mechanisme zien.

Door het mislukken van het labelen van endogeen LSD1 *via* een twee-staps proces werden we genoodzaakt om onze studies te vervolgen met gebiotynyleerde vormen van alkyne bevattende moleculaire sondes om deze vervolgens een klikreactie te laten ondergaan met azide-PEG3-biotine. Verassend was dat voor alle verbindingen incubatie met menselijk recombinant LSD1, in het geval van **7.8** door UV bestraling, resulteerde in een dosisafhankelijke eiwit labeling welke een sterke interactie aantoonde tussen LSD1 en de cofactor FAD. Verschillende controle reacties omvatte het testen van de moleculaire sonde na eiwit warmte-inactivatie of behandeling met een niet TCP bevattende gebiotynyleerde verbinding. In beide gevallen werd geen luminescentie waargenomen wat suggereert dat labelen op



Figuur 4. Structuur van moleculaire sonde **7.8** en blot luminescente detectie van menselijk recombinerend LSD1 behandeld met verschillende concentraties van voorgeklikt moleculaire sonde. Controle reacties zijn ook getoond. ΔT; warmte-denaturatie controle, PC; positieve controle.

actief eiwit is gebaseerd. Ondanks behandeling met LSD1 inhibitoren gevolgd door een korte incubatie met voorgeklikt moleculaire sonden resulteerde dit niet in een duidelijke reductie van labeling, maar verdere analyse is nodig om het scenario van enzym activiteitsafhankelijkheid alsmede een andere plaats voor modificatie van TCP gebaseerde moleculaire sondes te onderzoeken. Ten slotte werd voorgeklikt moleculaire sonde **7.8** toegepast op HeLa kernextracten waar los van andere intracellulaire eiwitten geen duidelijke labeling van endogeen LSD1 zichtbaar was. Verder studies naar de identificatie van gelabelde eiwitten en onderzoek naar het mechanisme van LSD1 inactivatie door de ontwikkelde moleculaire sondes worden momenteel uitgevoerd. Uiteindelijk kunnen de resultaten van zulke experimenten de basis zijn voor een grondiger onderzoek van LSD1 als nieuw farmacologisch doel.

De in dit proefschrift beschreven resultaten maken het mogelijk om de bioorthogonale oxidatieve Heck reactie toe te passen voor de detectie van metabolische labeling van cellulaire substraten met behulp van alkeen gelabelde metabole precursors. Daarnaast heeft dit werk geresulteerd in de ontdekking van nieuwe krachtige photoschakelbare HDAC remmers als potentiële antikankermiddelen en HDAC remmers met veelbelovende anti-inflammatoire eigenschappen. Tot slot, zijn er experimenten gedaan om te komen tot stoffen die toegepast kunnen worden voor het labelen van het enzym LSD1 op basis van zijn activiteit. Deze studies geven aan dat het werkingsmechanisme van TCP-gebaseerde remmers verder onderzocht moet worden om deze aanpak succesvol te maken en toe te passen in studies naar de rol van dit enzym in carcinogenese.

Acknowledgements

For the past few months my ultimate goal has been to perform the last experiments needed and finish the writing of my thesis at the scheduled time so that I could close this chapter of my life and move on. And now, here I am, typing the last words and, yet, having a bitter taste as I see the end approaching: an end to a wonderful journey through the PhD's up and downhills, full of memorable experiences that definitely contributed in the building of my character. Thus, it is time to say goodbye and thank all these people that helped me make every page of this work real.

First and foremost, I would like to express the most of my gratitude to my supervisor *Prof. Frank J. Dekker*, the person that made everything possible. It has been an honor to be chosen and work in his team. I heartily thank him for the unique opportunity to expand my knowledge in the field of Chemical Biology in a laboratory that I like to call 'working paradise'. I truly appreciate all the things he has offered me, from funding my PhD to sharing his ideas and valuable time through planning and guiding my projects. Both consciously and unconsciously, he has been my mentor in pleasant and difficult times, always there with a solution to the problem and his contagious motivation and will. I, sincerely, could not wish for a better leader than you. Thank you *Frank* for allowing me to grow as a scientist but also as a person. Because of you I leave the Netherlands with a CV full of skills and a whole new perspective. I wish you a happy, healthy and prosperous life next to *Willeke* and your beautiful children, *Geert* and *Anneleen*.

Secondly, I would like to thank my promotor *Prof. Hidde J. Haisma* for all his helpful advice and guidance from the beginning till the end of my PhD. His door was always open for me and he created a warm and friendly environment, even though my home was far away. Thank you *Prof. Haisma* for all the times you welcomed me in your house (ground or floating) and for fixing immediately any issues that may arised.

Thirdly, I feel grateful to my external advisor and great researcher *Prof. Adriaan J. Minnaard* for sharing his wisdom and experience whenever it was needed.

I would also like to thank the members of my reading committee, *Prof. A. S. S. Dömling*, *Prof. P. van der Veken* and *Prof. J. G. Roelfes*, for their willingness to read and assess my thesis.

Special thanks go to *Dr. Dante Rotili* and *Prof. Mai* for guiding me in my very early steps of research career and supporting strongly my decision to pursue a PhD in the University of Groningen.

Nothing of this would have happened without the continuous encouragement and inspiration driven by my Greek professors *Prof. Emmanuel Mikros*, *Prof. Panagiotis Marakos* and *Prof. Nicole Poulí*. I have to admit that *Prof. Mikros'* determination to pursue an Erasmus program in Italy in 2012 was definitely the leverage I needed to continue my research career abroad.

As for my paranymphs, *Kaja Sitkowska* and *Martijn R. H. Zwinderman*, there are not enough words to describe how grateful I am. They are both very charismatic, artistic people with pure souls and plenty to offer. My gorgeous *Kaja*, thank you

for all our discussions, tips, coffees and drinks, the amazing time in Warsaw and all the moments you stood by me. Our laughs and girl-talks, weird most of the times, will stay in my mind forever. I wish you all the luck in the world in pursuing and achieving what you desire, cause you simply deserve it! *Martijn*, I would like to thank you for all the things I learned from you being my very first student and many many more after that. Your kindness, intelligence and selflessness will never stop surprising me. You are an authentic giver. I will never forget our great times while making Greek 'spanakopita', our arguments on Dutch (horrible) weather and habits (mainly on the 'going Dutch' one) as well as the numerous, ridiculous bets, that only we could settle. I hope you do well and find something worthy of your various talents and I have no doubt you will be great at it.

Wiktor Szymanski, my other dear Polish friend, I simply feel blessed knowing you. You have been one the most important persons in my Groninger life. I am grateful that I have been given the chance to experience you as a colleague, as a mentor and, above all, as a friend. You are able to accomplish whatever you set your mind to. The sky's the limit. I, honestly, have never met in my life a more responsible, caring, smart and respectful scientist. You are my role model. Thank you for trusting, assisting and believing in me. I wish you, from the bottom of my heart, a healthy and fruitful life, exactly as you imagine it, next to beautiful *Adam* and wonderful *Alicja*, cause as we say in Greece 'behind a successful man there is a successful woman'!

A big thank you goes to the people of the Pharmaceutical Gene Modulation group (now known as Chemical and Pharmaceutical Biology). My dear *Janine*, thank you for taking care of everything and for all the presents and trips that you kindly organized. Because of you I never had to worry about any bureaucratic issue, you made my PhD life much easier. You are the glue that holds us together. *Petra*, thank you for being the lab manager that everyone could depend on. Your personality goes far beyond your knowledge and skills. When I see you cleaning the lab, even though it was not your duty week, I immediately see the mother in you. You were always there for help and advice, even when it had nothing to do with research and I truly appreciate it. I wish all the best for you and your family. *Robbert*, I do not remember exactly how many researchers with tough protein questions were coming directly to you, but I think this alone says a lot about your major scientific experience. I do remember though plenty of funny moments and stories we shared together and I hope you will always be the cheerful person that I got to know. Thank you for advising and encouraging me when, even at crazy working hours, I was coming across some negative results, thinking for a moment that that was the end of the world. Thank you also for teaching me that 'work never ends' and that 'cheap is expensive'. *Niek*, oh *Niek*, I am so going to miss hearing the 'hola chica' every morning from you! Thank you for your instructions and guidance throughout my PhD. Big thanks for making the lab alive by turning on the radio the moment you stepped in. I seriously remember numerous moments with dancing, singing and laughing tears on my face. Man, honestly, I still do not know in case the building caught fire and you were the one to announce it, if I would believe you! You have my warmest wishes for you and your family.

As for the PhD students, I want to thank the ladies first: the sweet *Théa* for all the unforgettable times we spend together inside and outside the lab. Thank you for your kindness, discretion and interest you showed to any situation. I have never experienced with you the 'Dutch directness'. *Hannah*, my girl that kept me company at 7:30 in the lab, when not even the cleaning people could be heard, but only one of us yelling here and there 'enzyme timeeee!!' and seriously running towards the -80 room. I am going to miss big time our nonsense conversations at these early hours but also you notifying the guys for any inappropriate joke or swearing of theirs. Thank you for the time you spent giving me valuable advice but, most of all, for the compassion we felt for each other when our enzymes or assays were failing us (many many MANY times). I think after your PhD you can easily write your own book on enzyme kinetics. I know I would read it! *Olivia*, even though I was completely unrelated to your research project, we got close enough at our room 0342. I can not count the times when we stared outside the window and commented on the rainy (again!) weather and how we were going to get back home. From the first days I knew we were able to 'speak the same language' even though we come from different countries. Thank you for our amazing time in Faro and for filling the office with smiles and warmth with your Mexican style! I wish you girls all the luck in pursuing what you want the most and to always be happy.

A great thank you to my favourite Chinese guys, *Hao* and *Bin*, who are two of the most optimistic persons I have ever met in my life. Your kindness and respect to other people is unbelievable and comes directly from your culture. Thank you for our long talks on our traditions (mainly centered around food!) and our swimming times. Thank you *Hao* for all the patience you have shown during 'photo times' and thank you *Bin* for the hilarious moments in our office that were really cheering everyone up. I am going to miss you guys so much!

Special thanks to the students that joined us temporarily but certainly left their own mark in my memory: *Philbert*, *Joram*, *Johan*, *Stephanie*, *Solomon*, *Wouter*, *Ana-Raquel*, *Marta*, *Johanna*, *Anne-Juliette*, *Hessel*, *DominiK*, and *Fransesca*. Thank you also *Kim*, *Anouk*, *Andries* and especially *Stefano* for our loud, ridiculous and funny moments in and outside of the office and our running times. La cosa está dura! Al menos!

I am deeply thankful to *Dr. Alessia Lenoci* for her help, collaboration and friendship but also for all the outstanding things we went through! I wish that her bad luck in the lab pays her off to everlasting, true happiness and success. Arrivederci my girl!

A big thank you goes to *Rianne Jongman*, my editing lady as I like to call her, for our fast and great collaboration on making this thesis a beautiful book.

My sincere thanks to the Greek, very skilled researchers, *Dinos*, *Trifonas* and *Nick*. Thank you *Dinos* for your pearls of wisdom and guidance. Now I understand what you meant by saying that 'PhD is not a sprint, but a marathon'. Many thanks to *Trifonas* and *Nick* for offering their help whenever I needed it. I wish you all a joyful and prosperous life with all your goals achieved.

I could never forget to express my heartfelt gratitude to my dearest Dutch friend, *Edwin*, for the innumerable times he was there for me. Whenever I

observed him genuinely sacrificing time, explaining and helping out others, I saw an honest, qualified scientist and a caring, altruistic and generous man. *Edwin*, thank you for making me think like you many times. Our historic attendance to the 'dirty' mud walking, the Organic Chemistry Practical Course and, of course, our never-won pubquiz Wednesday nights in De Toeter with *Iris* and *Martijn* are only some of the memories that will never fade away. I can only hope your every single dream comes true. I feel lucky to be your friend and really wish you stay in my life.

As for our neighbors, I feel obligated to warmly thank *Jan-Ytzen*, *Bert-Jan*, *Ronald*, *Pieter*, *Prof. Gerrit J. Poelarends*, *Eman*, *Patil*, *Ajay*, *Ting*, *André*, *Jan Visser*, *Catharina* and *Edward* for their friendship, assistance and helpful advice.

As much contradictory as it may sound, people outside the research world had incredible impact on my research competence and performance. First of all, I would like to thank my dear friends *Paul*, *Stef* and *Jessica* for all the fun we had in and outside the gym. Thank you guys for our plenty amazing board games nights, drinks, laughs and, of course, for keeping me fit! Hope to see you in Greece!

Huge thanks to all of my friends from Greece that were mentally sharing this four-year experience with me. *Dimitra Vacileiou*, *Afroditi*, *Fantia*, *Maria Karvouni*, *Dimitra Tomara*, *Martha*, *Xenia*, *Myrsini*, *Ioanna*, *Vaso*, *Kosta*, *Alexi*, *Niko*, *Maria Xenaki*, *Gianni*, a million words of thank you are not enough to describe how I feel. You were, are and will be my sunshine and my shoulder to lean on. Thank you for telling me what I need to hear, not what I want to hear. Without you I have no idea where I would be and I know that your love for me is what is keeping my head above the water.

Mom, *dad*, *Stella* I owe you an enormous debt of gratitude for being my joy, my endless support, my sanity. Thank you for being the examples of unconditional love, integrity and hard work. I consider myself fortunate to share the same genes with you. Thank you for your patience, thank you for your trust, thank you for the person I have become.

Lastly, I would like to extend my truthful appreciation and gratitude to *Rijksuniversiteit Groningen*, for its excellent organization, top level research and for providing me with inestimable knowledge, wisdom and skills.

Thank you all! Moi!

Marilena

Curriculum Vitae

Maria-Eleni Ourailidou was born on January 5, 1990, in Athens, Greece. She grew up in the smallest municipality of Athens, Imittos, where she graduated top of the class from her pre-university education (1st Lyceum of Imittos) in 2007. She then studied Pharmacy in the National and Kapodistrian University of Athens and obtained her 5-year MSc diploma on December 2012 with a grade of excellence. Her Msc thesis project, entitled 'Design, synthesis and biological evaluation of new modulators of epigenetic targets', was conducted during an Erasmus program in Sapienza University of Rome under the supervision of Prof. Antonello Mai. In November 2012 she moved to Groningen and started her PhD project in the department of Chemical and Pharmaceutical Biology under the guidance of Prof. Frank J. Dekker. In the meantime, in March 2014, she obtained the license for the professional qualification of pharmacist. Her PhD research focused on the development of novel chemistry-based methods for monitoring enzyme activity *in vitro* and small-molecules for the detection and inhibition of enzymes involved in inflammation and cancer. The results of these studies are presented in this dissertation.

List of publications

- **Ourailidou, M. E.**, van der Meer, J-Y., Baas, B-J., Jeronimus-Stratingh, C., Got-tumukkala, A. L., Poelarends, G. J., and Dekker, F. J. (2014) Aqueous Oxidative Heck Reaction as a Protein-Labeling Strategy. *Chembiochem* 15, 209-212.
- **Ourailidou, M. E.**, Dockerty, P., Witte, M., Poelarends, G. J., and Dekker, F. J. (2015) Metabolic alkene labeling and *in vitro* detection of histone acylation via the aqueous oxidative Heck reaction. *Org. Biomol. Chem.* 13, 3648-3653.
- Szymanski, * W., **Ourailidou, M. E.**,* Velema, W. A., Dekker, F. J., and Feringa, B. L. (2015) Light-Controlled Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Towards Photopharmacological Chemotherapy. *Chemistry* 21, 16517-16524. (*equally contributed)
- **Ourailidou, M. E.**, Zwinderman, M. R. H., and Dekker, F. J. (2016) Bioorthogonal metabolic labelling with acyl-CoA reporters: targeting protein acylation. *Medchemcomm.* 7, 399-408.
- van den Bosch, T., Boichenko, A., Leus, N. G., **Ourailidou, M. E.**, Wapenaar, H., Rotili, D., Mai, A., Imhof, A., Bischoff, R., Haisma, H. J., and Dekker, F. J. (2016) The histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 reduces pro-inflammatory gene expression and inhibits histone deacetylases. *Biochem. Pharmacol.* 102, 130-140.
- Leus, N. G., van der Wouden, P. E., van den Bosch, T., Hooghiemstra, W. T., **Ourailidou, M. E.**, Kistemaker, L. E., Bischoff, R., Gosens, R., Haisma, H. J., and Dekker, F. J. (2016) HDAC 3-selective inhibitor RGFP966 demonstrates anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophages and mouse precision-cut lung slices by attenuating NF- κ B p65 transcriptional activity. *Biochem. Pharmacol.* 108, 58-74.

