



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The versatility of asymmetric aminoethyl-tetrazines in bioorthogonal chemistry

Sarris, A.

Citation

Sarris, A. (2025, February 20). *The versatility of asymmetric aminoethyl-tetrazines in bioorthogonal chemistry*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4195419>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4195419>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de synthese, analyse van verschillende tetrazine-houdende verbindingen en het gebruik in de bioorthogonale chemie. In **hoofdstuk 1** wordt een literatuuroverzicht gegeven van de ontwikkelingen op het gebied van de tetrazine chemie door de geschiedenis heen. Daarnaast wordt een inleiding gegeven tot de opkomst van click chemie, bioorthogonale reacties en IEDDA chemie. Deze ontwikkelingen vormen de basis waarop het in dit proefschrift beschreven werk is gebouwd.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese van tetrazine-gemodificeerde alanine bouwstenen als gefunctionaliseerde aminozuren ter vervanging van natuurlijke aminozuren in activity-based probes (ABP's) voor bioorthogonale activity-based protein profiling (ABPP) van cysteine-, serine- en threonine-peptidasen.^{[1],[2]} Eén bouwsteen, Cbz-Tzm-OH (verbinding **2**, hoofdstuk 2), bleek gemakkelijk te verkrijgen via de ontwikkelde syntheseroute en kon worden opgenomen in kleine oligopeptide chloormethylketonen (CMK)^[3, 4] en benzyloxymethylketonen (BOMK)^[5, 6] om zo structuren te leveren die nauw verwant zijn aan bekende peptidase remmers. CMK-remmer **1** (**Figuur 1**) kon gemakkelijk worden bereid en werd met succes in bioorthogonaal ABPP gebruikt. Helaas was de CMK-groep te reactief en resulteerde deze in de modificatie van talrijke niet-gespecificeerde eiwitten wanneer deze op cel-lysaten werd toegepast. BOMK-remmer **2** (**Figuur 1**) werd ook gemakkelijk bereid, maar leverde een slechte eiwitmodificatie op. **Hoofdstuk 2** beschrijft ook de synthese van Boc-Tzm-OH (verbinding **12**, hoofdstuk 2) als bouwsteen voor ABPs. Na bevestiging van een kernkop aan het C-uiteinde waren alle pogingen om de Boc-groep te verwijderen echter niet succesvol.

Hoofdstuk 3 beschrijft de synthese van een bibliotheek van gefunctionaliseerde tetrazines, evenals de synthese en optimalisatie van verschillende reactieve alkenen. Het werk omvat kinetische studies om de reactiviteit van de bibliotheek van tetrazines ten opzichte van de verschillende gesynthetiseerde alkenen te bepalen. Bovendien werden deze tetrazines aan Bodipy-FL verbonden, waardoor tetrazine-fluorofor tags werden verkregen voor bioorthogonale levende-cel fluorescentie microscopie van alkeen-gefunctionaliseerde moleculen in de cell. De DOPE-lipiden^[10], mannosaminen^[11] en het in de natuur voorkomende sterculzuur^[12] werden in cellen geïncubeerd en vervolgens geïncubeerd met de tetrazine-fluoroforen. Dit resulteerde in een zwak fluorescentiesignaal voor beide de DOPE-lipiden en de mannosaminen. Verrassend genoeg gaven cellen die geïncubeerd waren met sterculzuur een sterk fluorescentiesignaal voor een specifieke reeks tetrazinens. Tetrazines gefunctionaliseerd met de amino-methyl-phenyl linker gaven een zeer sterk fluorescentiesignaal, terwijl er nagenoeg geen fluorescentie werd waargenomen voor tetrazines gefunctionaliseerd met een aminoethyl linker.

Hoofdstuk 4 beschrijft de synthese van goed wateroplosbare tetrazine fluoroforen. Deze fluoroforen waren in staat toegang te krijgen tot de dichte hydrofiele glycaancoating (glycocalyx) rond het celoppervlak en zo de metabolisch opgenomen alkeen-gefunctionaliseerde mannosamine (verbinding **62**, hoofdstuk 3) te labelen. Door sterculzuur en Bodipy-FL-tetrazine (verbinding **25**, hoofdstuk 3) te gebruiken als een tweede bioorthogonale paar, konden levende cellen worden geïncubeerd en simultaan gelabeld worden om zo multicomponent labeling ("dual labeling") van alkeen-houdende biomoleculen

te bereiken. Dit werd bereikt door alleen het gebruik van bioorthogonale IEDDA chemie zonder enige significante kruisreactiviteit.

In Hoofdstuk 5 werd de bibliotheek van tetrazines uit hoofdstuk 3 geanalyseerd op hun vermogen (met betrekking tot IEDDA-snelheid, eliminatiesnelheid en eliminatie-efficiëntie) om een IEDDA-pyridazine-eliminatie-tandemreactie uit te voeren^[18]. De bibliotheek, bestaande uit tetrazines gefunctionaliseerd met vrije aminen en N-Boc-beschermden aminen met verschillende spacers (methyl, ethyl of methyl-fenyl), werd geanalyseerd op hun reactiviteit en eliminatiesnelheid met AMC-coumarine, een eerder gebruikte methode uit de literatuur^[19]. De resultaten werden vergeleken met een reeks tetrazines uit de literatuur^[19], waaronder carboxyl-gefunctionaliseerde tetrazines^[20]. De data toonde aan dat aminoethyl-gefunctionaliseerde tetrazines, in het bijzonder tetrazines **6** (hoofdstuk 5) en **7** (hoofdstuk 5), ongekende eliminatiesnelheden vertoonden, gecombineerd met een respectabele eliminatie-efficiëntie. Deze snelheden waren voorheen alleen haalbaar met andere tetrazines door de pH te verlagen tot niet-fysiologische niveaus^[20]. In tegenstelling tot andere tetrazines werden tetrazines **6** (hoofdstuk 5) en **7** (hoofdstuk 5) vanwege hun aminoethyl-functionaliteit niet negatief beïnvloed door pH-veranderingen of het ontbreken van een zure omgeving. Hierdoor zijn ze hoogst waarschijnlijk een uitstekende keuze wanneer een hoge eliminatiesnelheid vereist is.

In Hoofdstuk 6 werd een hulpmiddel ontworpen en gesynthetiseerd uit bifunctioneel trans-cycloocteen en het EDANS/DABCYL-quencher-paar om de reactie- en eliminatiesnelheden van tetrazines bij het vrijkomen van alkylaminen correct te kunnen bepalen. Dit hulpmiddel is een uitstekende vervanging voor de eerder gebruikte AMC-coumarine methode omdat deze een aniline bevatte in plaats van een primair amine. Met behulp van computationele modellering van de meerstapsreactie in *Coach 7* en analyse van de resultaten met behulp van *Graphpad PRISM*, kon de tool gebruikt worden om specifieke eigenschappen van individuele tetrazines te bepalen wat betreft hun reactiesnelheid en eliminatiesnelheid. Bovendien werden meerdere gelijktijdige processen geïdentificeerd en gekwantificeerd en kon daarmee de snelheidsbeperkende stappen worden bepaald.