Universiteit
Leiden
The Netherlands

Development of new chemical tools to study the cannabinoid receptor type 2

Paus, L.V. de

Citation
Paus, L. V. de. (2024, May 22). *Development of new chemical tools to study the cannabinoid receptor type 2*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3754444

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/1887/3754444

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

Nederlandse samenvatting

Het gebruik van cannabis voor therapeutische doeleinden werd al in 2700 v.Chr. gedocumenteerd door keizer Sheng Nun in zijn farmacopee. Het werd beschreven als een hulpmiddel bij artritis, het opwekken van eetlust, depressie, ontstekingen, pijn, constipatie en meer. Het belangrijkste actieve ingrediënt in cannabis dat zorgt voor de psychoactieve effecten is Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC), dat in 1942 is ontdekt, hoewel de structuur pas sinds 1964 bekend is. Sindsdien is THC geaccepteerd als medicijn tegen door chemotherapie veroorzaakte misselijkheid, verbetering van de eetlust bij aids-patiënten en behandeling van symptomen bij patiënten met multiple sclerose (MS). De receptoren waarmee THC bindt, zijn de cannabinoïde receptor type 1 (CB_1R) en de cannabinoïde receptor type 2 (CB_2R). Deze receptoren maken deel uit van de familie van G-eiwit-gekoppelde receptoren en bevinden zich aan de buitenkant van cellen als onderdeel van het endocannabinoïde systeem (ECS). Dit systeem bestaat verder uit lipide-transmitters die kunnen binden aan de receptoren en enzymen die helpen bij de synthese en afbraak van endocannabinoïden. Het ECS-systeem speelt een belangrijke rol in meerdere fysiologische processen, waaronder cognitieve functie, immuunreacties en ook de psychoactieve effecten van cannabis.

CB_1R is de meest voorkomende G eiwit-gekoppelde receptor in de hersenen en speelt een rol in eetlust, leren, geheugen, angst, depressie en verslaving. Daarnaast speelt het een rol in neurologische aandoeningen zoals beroerte, MS, epilepsie en neurodegeneratieve ziekten. Buiten het zenuwstelsel is CB_1R betrokken bij pijnperceptie, ontsteking, energiemetabolisme, het maagdarmkanaal, het bewegingsapparaat, oogdruk, het hart- en vaatstelsel, klieren, reproductie en kanker. CB_2R bevindt zich voornamelijk in het immuunsysteem, inclusief de milt, amandelen, thymus en lymfocyten, en speelt een rol in ontstekingen en zou een rol kunnen spelen in verschillende auto-immuun- en neurodegeneratieve ziekten zoals Alzheimer en Parkinson.

THC maakt geen onderscheid tussen de type 1- en type 2-cannabinoïde receptoren en veroorzaakt als medicijn dus ook bijwerkingen, met name de psychoactieve effecten, door binding aan CB_1R. De afgelopen decennia is er veel onderzoek gedaan naar het begrijpen van de rol van CB_1R en CB_2R in verschillende ziekten en de ontwikkeling van therapeutische moleculen tegen deze ziekten. Desalniettemin hebben we nog maar beperkte kennis over de werking van de receptoren op moleculair niveau. Meer informatie is nodig om te helpen bij het ontwikkelen van werkzame medicijnen met minder bijwerkingen. Dit proefschrift beschrijft het ontwerp en de synthese van verschillende chemische moleculen die als 'tools' (letterlijk: gereedschappen) kunnen fungeren om de cannabinoïde receptoren te bestuderen.

In **Hoofdstuk 1** worden de twee receptoren waarmee THC bindt geïntroduceerd: cannabinoïde receptor type 1 (CB_1R) en cannabinoïde receptor type 2 (CB_2R). Er wordt uitgelegd hoe de receptoren werken en hoe ze zijn opgebouwd. De 3D-structuren van de CBR's, die zijn bepaald met behulp van kristallografie en cryogene elektronenmicroscopie, worden vergeleken. De momenteel beschikbare synthetische medicijnen worden besproken, evenals mogelijke methoden om problemen te omzeilen waar huidige CBR-medicijnen mee te maken hebben. Een aantal methoden worden besproken die receptoren zichtbaar kunnen maken, waaronder het gebruik van radio-isotopen of fluorescente moleculen; elektrofiele en fotoreactieve groepen kunnen het molecuul onomkeerbaar aan het eiwit binden. LEI-101 wordt geïntroduceerd, een CB_2R-selectief molecuul met een chemische structuur waarop verschillende moleculen in dit proefschrift zijn gebaseerd.

In **Hoofdstuk 2** wordt LEI-102 geïntroduceerd, gebaseerd op het LEI-101 molecuul. Dit nieuw gesynthetiseerde molecuul wordt, net als CP-55,940, APD371 en HU308, in complex gezet met CB_2R en wordt de 3D-structuur bepaald met behulp van een elektronenmicroscoop onder cryogene condities. Hiermee wordt de ligging van de moleculen in CB_2R bekeken. Een aantal aminozuren die zich op of bij de interface van de moleculen en het eiwit bevinden, zijn gekozen om te veranderen. Zo kon worden onderzocht wat de invloed was van die aminozuren op het binden van de moleculen en de activiteit van de receptor. Deze resultaten leidden tot een aantal observaties, bijvoorbeeld dat lipofiele moleculen een eigen "zij-ingang" naar de binnenkant van CB_2R en CB_1R lijken te hebben. Verder was er een verschil tussen de moleculen en hoe belangrijk bepaalde aminozuren waren voor de activatie van de receptor. Zo was histidine 2.65 (Ballesteros-Weinstein-nummering) belangrijk voor CB_2R-activatie met LEI-102, CP-55,940 en APD371, echter gaf het molecuul HU308 geen verandering in receptoractiviteit als de histidine 2.65 was gemuteerd. Fenylalanine 3.36 is belangrijk in CB_1R om activiteit te voorkomen, en een mutatie naar alanine zorgt voor constitutieve activatie. Dit gebeurt echter niet in CB_2R, waar een mutatie in fenylalanine 3.36 ervoor zorgt dat geen enkele molecuul meer in staat is CB_2R te activeren. De kleinste homologie tussen de receptoren zit in de lengte van extracellulaire lus 2 (ECL2), deze lus is groter en telt meer aminozuren in CB_1R dan in CB_2R. Moleculen die normaal selectief werken op alleen CB_2R kregen een kleine affiniteit voor CB_1R als een aminozuur in de lus wordt vervangen door een ander aminozuur dat daar aanwezig is in CB_2R. Het lijkt dus dat deze lus belangrijk is voor selectiviteit.

In **Hoofdstuk 3** wordt LEI-121 geïntroduceerd, een chemische ‘probe’ (letterlijk: sonde) die als gereedschap kan worden gebruikt om CB_2R te bestuderen. Het molecuul heeft een diazirine, een kleine groep die uiteenvalt in een zeer reactieve groep als deze wordt beschenen met ultraviolet licht. De zeer reactieve groep reageert snel met een andere groep in de buurt om een onomkeerbare binding te maken. Als dit gebeurt wanneer het molecuul in de CB_2 receptor zit, dan bindt de groep aan het eiwit vast. Daarnaast bevat LEI-121 een driedubbele koolstofbinding, een alkyn. Dit is een aanknopingspunt om iets anders aan te bouwen. Zo kan LEI-121 eerst met CB_2R binden, en dan pas wordt er bijvoorbeeld een fluorescerende groep op gezet zodat de receptor zichtbaar wordt. Twee variaties op LEI-121 worden gesynthetiseerd en vergeleken met LEI-121. Deze zorgen er, net zoals LEI-121, voor dat de receptoractiviteit omlaag gaat (inverse agonist) als het molecuul is gebonden. Een nieuwe ‘probe’ wordt ook geïntroduceerd waarvan de structuur meer lijkt op LEI-102, maar waarbij de diazirine en alkyn nog steeds aanwezig zijn. Deze nieuwe ‘probe’ zorgde juist voor verhoging van receptoractiviteit (agonist) na binden, vergelijkbaar met LEI-102. Met deze nieuwe ‘probe’ kunnen nieuwe receptorconformaties worden bestudeerd.

Hoofdstuk 4 gebruikt de structuur van het LEI-102-CB_2R-complex om nieuwe ‘probes’ te maken die geen alkyn bevatten, maar waarbij de fluorescerende probe al in het molecuul is gebouwd. Opnieuw werd de LEI-102 structuur als beginpunt gebruikt met een kleine aanpassing om het inbouwen van de fluorescerende groep mogelijk te maken. Er werd gevonden dat het molecuul met de hoogste affiniteit voor CB_2R nu een inverse agonist was. Het voordeel van de fluorescerende groep die al aan het molecuul is vastgemaakt, is dat nu geen extra stap nodig is tijdens het experiment. Een reactie kost tijd, en tijdens bepaalde experimenten heb je dat niet. Daarnaast voorkom je dat er koper (d.w.z. een katalysator die nodig is voor de reactie) bij je cellen komt, wat toxisch is en de experimentele uitkomst zou kunnen beïnvloeden. Deze nieuwe ‘probe’ is dus een aanvulling op de ‘probes’ uit hoofdstuk 3.

Ondanks de psychoactieve effecten van CB_1R is er nog veel medicijnonderzoek naar moleculen die aan CB_1R binden. Er zijn namelijk ook veel positieve effecten die we zien bij onder andere THC die te herleiden zijn tot de type 1 receptor. Met de ontdekking dat CB_1R zich niet alleen op het celmembraan, maar ook op mitochondriën bevindt, is er de vraag of er een verschil zit in de signalen van de twee

subgroepen. Er is al gevonden dat mitochondriaal CB_1R effect heeft op leren en geheugen, en eetgedrag. **Hoofdstuk 5** bespreekt de synthese van CB_1R-bindende moleculen op basis van de ORG28611-structuur die specifiek naar de mitochondriën kunnen bewegen vanwege hun negatieve lading. Het doel is om op den duur te onderzoeken of de psychoactieve en medicinale effecten worden veroorzaakt door een of beide subgroepen, en of deze hetzelfde of verschillend zijn. De moleculen die zijn ontworpen en gesynthetiseerd waren maar matig actief en optimalisatie zal nodig zijn voordat verdere proeven kunnen worden uitgevoerd.

Hoofdstuk 6 vat de resultaten van de voorgaande hoofdstukken samen en bespreekt wat de volgende stappen van het onderzoek zullen inhouden. Daarnaast wordt de synthese van een prodrug op basis van LEI-102 beschreven. Een prodrug is een molecuul dat is aangepast om een bepaalde eigenschap te verbeteren, zoals bijvoorbeeld oplosbaarheid of de tijd dat het stabiel blijft in het lichaam. Wanneer het molecuul op de juiste plek is aangekomen, zullen lichaamseigen enzymen de prodrug deels afbreken zodat het actieve molecuul achterblijft. Die kan dan met het 'doelwit' (letterlijk: target) binden en zijn werking uitvoeren. De prodrug besproken in hoofdstuk 6 heeft een lipofiele 'staart' aan LEI-102 gekoppeld zodat deze in een capsule van lipiden kan worden geplaatst. In deze lipide capsule kan LEI-102 beschermd naar de CB_2 receptor worden vervoerd, waar de staart er door enzymen wordt afgehaald en LEI-102 met hoge affiniteit kan binden. De synthese van de prodrug is afgerond en de volgende stap zou het vergelijken van de prodrug + capsule zijn met LEI-102 in vivo.

Dit proefschrift laat het ontwerp en de synthese van verschillende nieuwe 'tools' zien die gebruikt kunnen worden voor het verder bestuderen van CB_1R en CB_2R. Verder wordt het belang van 3D structuren van eiwitten in complex met bindende moleculen laten zien voor het begrijpen van hoe selectiviteit, activiteit en signaalvoorkeur door de moleculen worden gestuurd. Daarnaast kunnen 3D structuren worden gebruikt voor het ontwerp van nieuwe 'probes' en potentiële medicijnen. Pas als we begrijpen hoe de cannabinoïde receptoren werken kunnen we effectief *in vitro* resultaten van moleculen veranderen in effectiviteit in de kliniek. Dit zou gecombineerd kunnen worden met een methode om moleculen langer stabiel te houden, bijvoorbeeld door middel van een capsule. De 'tools' ontworpen in dit proefschrift kunnen in de toekomst helpen met uitzoeken hoe CB_2R zich gedraagt in ziektes en hoe we daar medicijnen voor zouden kunnen ontwikkelen.