



Doctoral Thesis

Out of the Dark, Into the Light: Fluorescent and Photoswitchable Probes for Cannabinoid Receptors

Author(s):

Sarott, Roman Clà

Publication Date:

2021

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000492206> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 27609

Out of the Dark, Into the Light: Fluorescent and Photoswitchable Probes for Cannabinoid Receptors

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH
(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

ROMAN C. SAROTT

M.Sc. ETH Chemistry

born 06.10.1991

citizen of Scuol (GR)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Erick M. Carreira, examiner

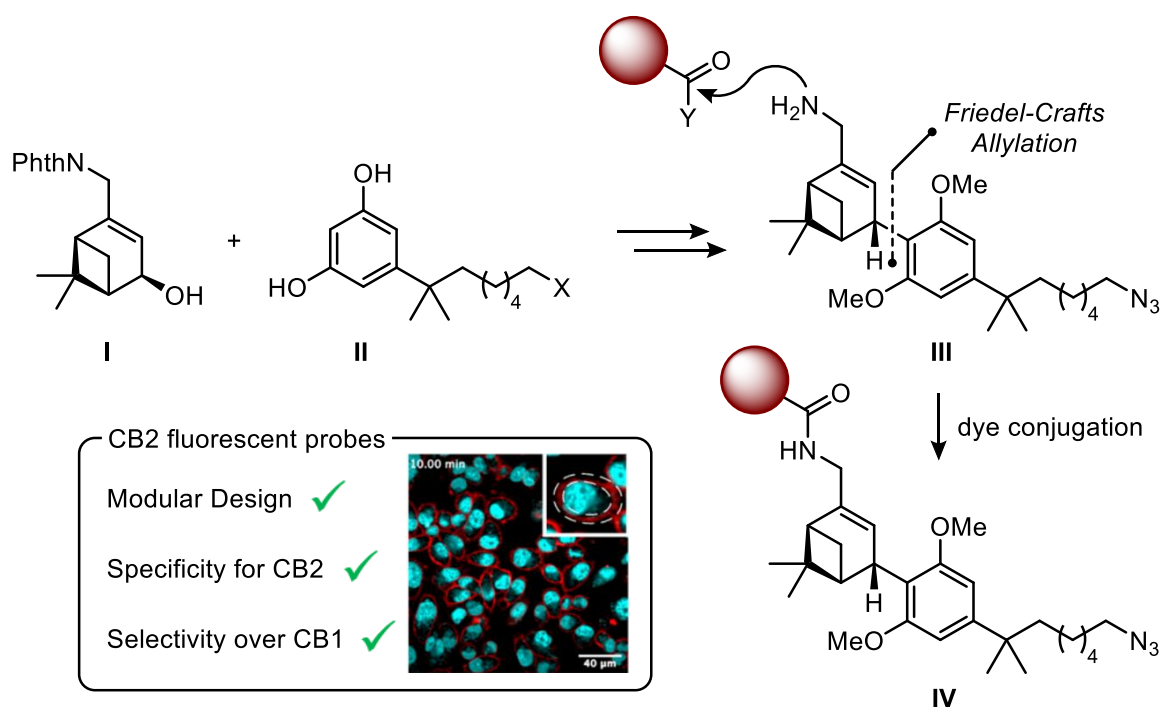
Prof. Dr. Helma Wennemers, co-examiner

2021

Abstract

The endocannabinoid system is involved in numerous physiological processes relevant to human disease. Cannabinoid receptors 1 (CB1) and 2 (CB2) are integral components of this ubiquitous lipid signaling system, and their pharmacological modulation holds promise for the treatment of various pathologies ranging from central nervous system to autoimmune disorders and pain. However, therapeutic targeting of cannabinoid receptors is critically hampered by limited understanding of fundamental receptor biology, likely owing to a lack of suitable tools. The goal of this work is to harness the power of synthesis to develop state-of-the-art chemical probes, facilitating in-depth study of CB1 and CB2.

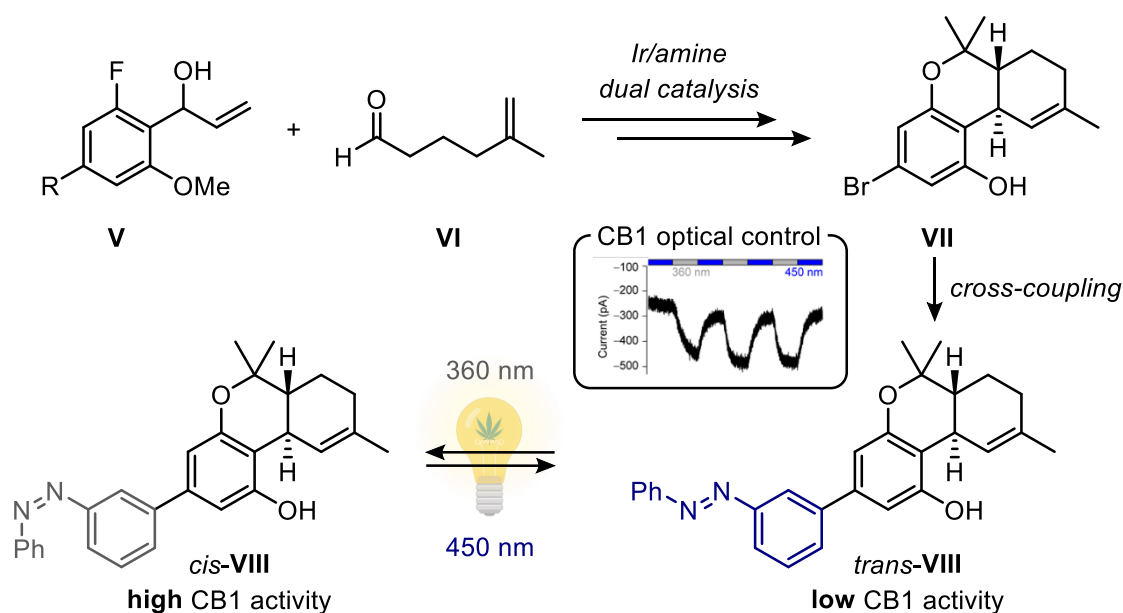
The first part of this thesis describes the design and synthesis of highly specific fluorescent probes aimed at studying the expression of CB2 in tissue- and disease-dependent contexts. This endeavor necessitated the design of a novel high-affinity, CB2-selective ligand. For this purpose, we identified key structural elements of different reported cannabinoid receptor ligands to generate a chimera. Synthesis of this chimeric ligand was enabled by a modular synthetic sequence involving an asymmetric FRIEDEL–CRAFTS allylation of **I** and **II**, giving rise to a versatile ligand platform (**III**) for the preparation of high-affinity CB2 probes (Scheme I). Amine **III** was conjugated to fluorescent dyes via short alkyl linkers, furnishing a collection of fluorescent probes **IV** with unprecedented affinity to CB2 and selectivity over CB1.



Scheme I. Modular design of highly specific fluorescent probes for CB2 enabled by the synthesis of versatile building block **III**.

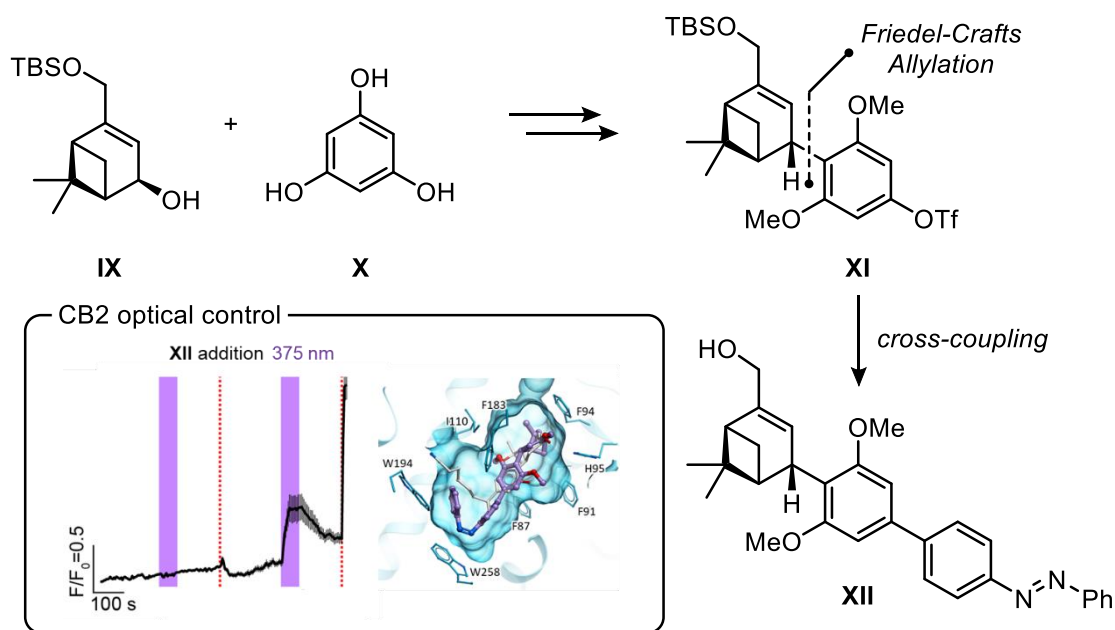
Our probes were comprehensively profiled in collaboration across laboratories, applications, and cell-lines. In fluorescence-activated cell sorting studies, the fluorescent probes specifically labeled cells expressing human and mouse CB2 isoforms and were successfully applied to the study of activated microglial cells derived from a rodent model of Alzheimer's disease. Moreover, the fluoroprobes enabled real-time monitoring of CB2 on primary cells without interference from nonspecific membrane binding. Together, our fluorescent probes allow for direct and highly specific detection of CB2, overcoming the limitations of all previously reported chemical probes as well as of current antibody technology. Additionally, they were used for the development of a time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) assay amenable to high-throughput determination of saturation and kinetic binding parameters of CB2 ligands. Realizing the potential impact of this assay on drug discovery processes, we expanded its use to CB1 by means of THC-based fluorescent tracers.

The second part of this thesis details our design of photochromic ligands, culminating in the high-precision optical control over CB1 and CB2 signaling. Capitalizing on an efficient synthesis, a salient feature of which was an asymmetric, dual-catalytic reaction of **V** and **VI**, building block **VII** was employed for the preparation of photoswitchable Δ^9 -THC derivatives (**VIII**, *azo*-THCs) by late-stage introduction of azobenzene residues by means of cross-coupling chemistry (Scheme II). *Azo*-THCs emerged as CB1 agonists with light-dependent potency and efficacy and enabled reversible, spatiotemporal control over CB1 signaling as demonstrated in whole cell patch-clamp electrophysiology and cAMP assay.



Scheme II. Asymmetric synthesis of photoswitchable Δ^9 -THC derivatives enabled optical control over CB1 signaling.

Optical control over CB2 signaling required the development of bespoke probes (Scheme III). An efficient synthetic strategy based on FRIEDEL–CRAFTS allylation of **IX** and **X** furnished **XI**, which served as building block for the preparation of photoswitchable CB2 agonists (**XII**). In the course of our collaborative efforts, we found that benchmark CB2 agonist HU-308 triggers Ca^{2+} transients in AtT-20(CB2) cells via CB2, and **XII** exerted optical control over this pathway by which CB2 modulates cellular excitability. Molecular docking studies provided insight into the structural determinants governing light-dependent activity of our photoswitchable ligands, which serves as basis for the design of additional, tailor-made tools.

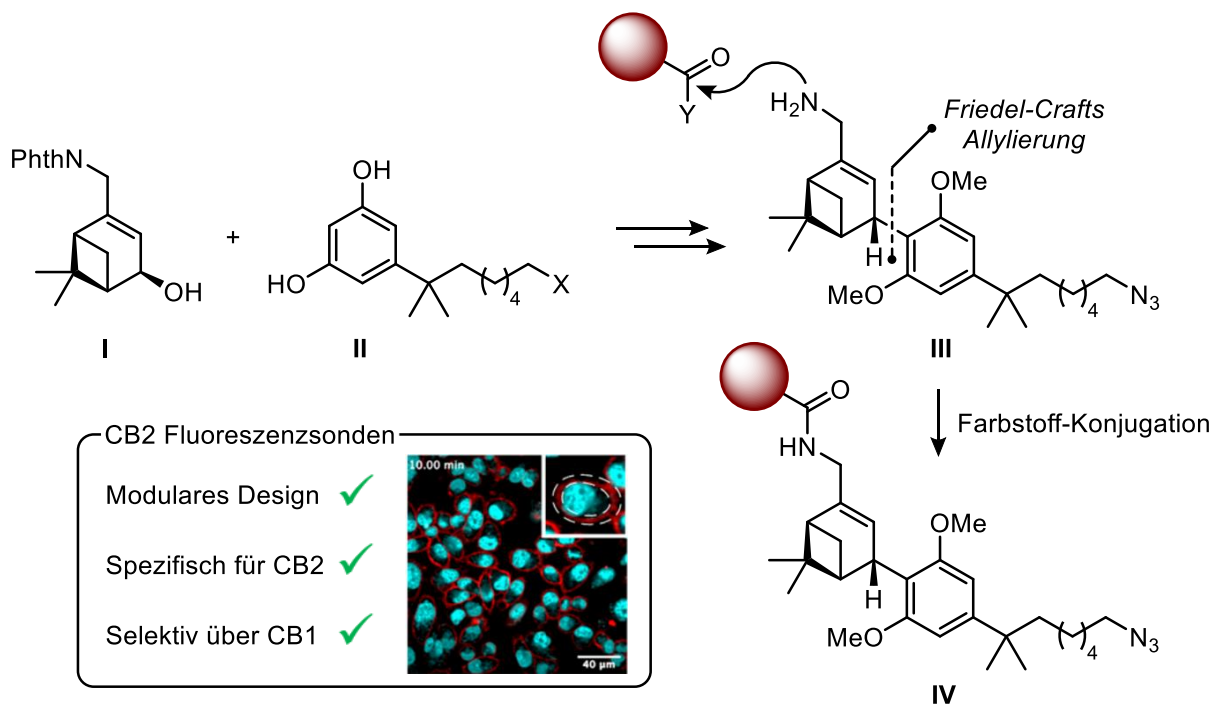


Scheme III. Photoswitchable derivatives of agonist HU-308 exert optical control over CB2-mediated Ca^{2+} transients.

Zusammenfassung

Das Endocannabinoid-System ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt, die für menschliche Krankheiten relevant sind. Die Cannabinoid-Rezeptoren 1 (CB1) und 2 (CB2) sind integrale Bestandteile dieses universellen Lipid-Signalsystems, und ihre pharmakologische Manipulation ist vielversprechend für die Behandlung verschiedener Pathologien, die von Erkrankungen des zentralen Nervensystem bis hin zu Autoimmunerkrankungen und Schmerzen reichen. Die therapeutische Nutzung von Cannabinoid-Rezeptoren wird jedoch durch ein begrenztes Verständnis der grundlegenden Rezeptorbiologie erschwert, was wahrscheinlich auf einen Mangel an geeigneten Werkzeugen zurückzuführen ist. Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese neuartiger chemischer Sonden, welche eine detaillierte Untersuchung von CB1 und CB2 ermöglichen.

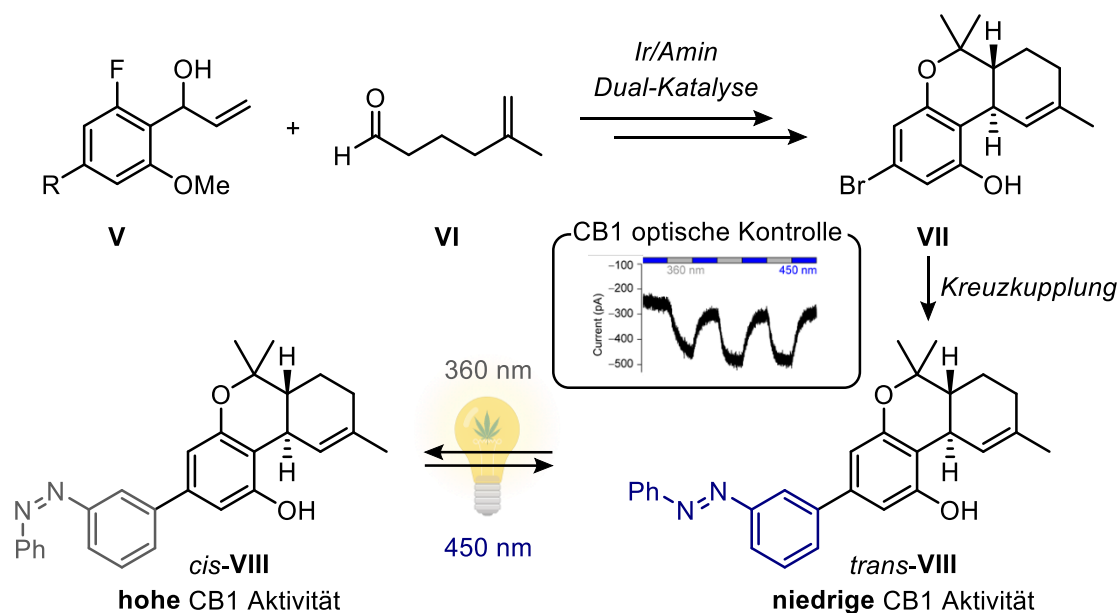
Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt das Design und die Synthese von hochspezifischen Fluoreszenzsonden, um die Expression von CB2 in gewebe- und krankheitsabhängigen Kontexten zu erforschen. Dieses Unterfangen erforderte den Entwurf eines neuartigen, hochaffinen, CB2-selektiven Liganden. Zu diesem Zweck identifizierten wir strukturelle Schlüsselemente verschiedener bekannter Cannabinoid-Rezeptor-Liganden. Die Kombination dieser Merkmale wurde durch eine modulare synthetische Sequenz ermöglicht, die eine asymmetrische FRIEDEL-CRAFTS-Allylierung von **I** und **II** beinhaltet, wodurch eine vielseitige Ligandenplattform (**III**) für die Herstellung von hochaffinen CB2-Sonden entstand (Schema I).



Schema 1. Modulares Design von hochspezifischen Fluoreszenzsonden für CB2, ermöglicht durch die Synthese des vielseitigen Bausteins **III**.

Das Amin **III** wurde über kurze Alkyl-Linker mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert, wodurch eine Reihe von Fluoreszenzsonden **IV** mit exzellenter Affinität zu CB2 und Selektivität gegenüber CB1 erhalten wurde.

Unsere Sonden wurden in Zusammenarbeit mit mehreren Forschungsgruppen und in verschiedenen Anwendungen und Zelllinien umfassend profiliert. In Studien zur fluoreszenzaktivierten Zellsortierung markierten sie spezifisch Zellen, die menschliches oder Maus-CB2 exprimieren, und wurden erfolgreich zur Untersuchung von aktivierten Mikrogliazellen aus einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit eingesetzt. Darüber hinaus ermöglichten die Fluoreszenzsonden die Beobachtung von CB2 auf Primärzellen in Echtzeit, ohne Interferenz durch unspezifische Membranbindung. Zusammengefasst ermöglichen unsere fluoreszenten Liganden den direkten und hochspezifischen Nachweis von CB2 und überwinden damit die Limitierungen aller bisher bekannten chemischen Sonden sowie der aktuellen Antikörpertechnologie. Darüber hinaus wurden sie für die Entwicklung eines zeitaufgelösten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (TR-FRET) Assays verwendet, der eine Hochdurchsatz-Bestimmung der Gleichgewichts- und kinetischen Bindungsparameter von CB2-Liganden ermöglicht. Da wir die möglichen, positiven Auswirkungen dieses Assays auf die Arzneimittelentwicklung erkannten, erweiterten wir die Anwendung auf CB1 mit Hilfe von THC-basierten Fluoreszenzsonden.

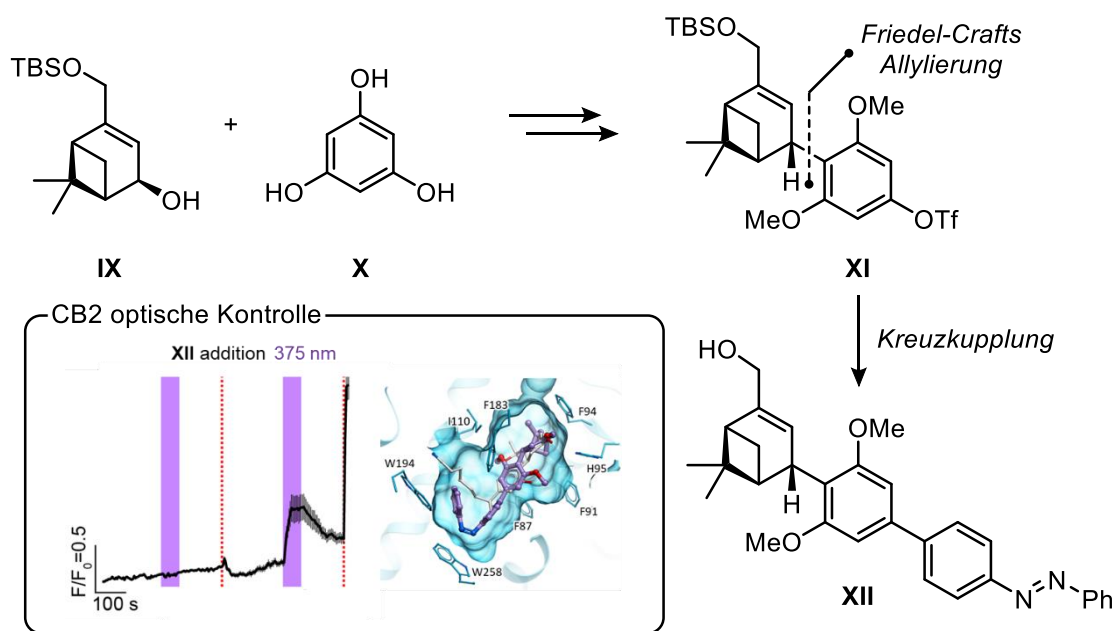


Schema 2. Asymmetrische Synthese von photoschaltbaren Δ^9 -THC-Derivaten ermöglichte die optische Kontrolle von CB1.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt unser Design von photochromen Liganden, das in der hochpräzisen optischen Kontrolle der CB1- und CB2-Signaltransduktion resultierte. Eine effiziente Synthese, deren besonderes Merkmal eine asymmetrische, dual-katalytische Reaktion von **V** und **VI** war, ermöglichte Zugang zu Baustein **VII** (Schema II). Photoschaltbare Δ^9 -THC-

Derivate (**VIII**, *azo*-THCs) wurden durch späte Einführung von Azobenzolresten mittels Kreuzkupplungschemie hergestellt. *Azo*-THCs erwiesen sich als CB1-Agonisten mit lichtabhängiger Wirksamkeit und ermöglichten die reversible, spatiotemporale Kontrolle von CB1, wie mittels Patch-Clamp-Elektrophysiologie und im cAMP Assay gezeigt wurde.

Die optische Kontrolle von CB2 erforderte die Entwicklung von maßgeschneiderten Sonden (Schema III). Eine effiziente Synthesestrategie, die auf der FRIEDEL-CRAFTS-Allylierung von **IX** und **X** basiert, lieferte **XI**, das als Baustein für die Herstellung von photoschaltbaren CB2-Agonisten diente (**XII**). Im Laufe unserer Untersuchungen fanden wir heraus, dass der etablierte CB2-Agonist HU-308 Ca^{2+} -Transienten in AtT-20(CB2)-Zellen via CB2 auslöst. Sonde **XII** übte optische Kontrolle über diesen Signalweg aus, über den CB2 die zelluläre Erregbarkeit moduliert. Molekulare Modellier-Studien lieferten Einblicke in die strukturellen Determinanten, welche die lichtabhängige Aktivität unserer photoschaltbaren Liganden bestimmen, was als Grundlage für das Design weiterer, maßgeschneiderter Werkzeuge dient.



Schema 3. Photoschaltbare Derivate des Agonisten HU-308 ermöglichen die optische Kontrolle von CB2-vermittelten Ca^{2+} -Transienten.