

MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Analyse der Modulation von ROR-gamma durch Steroide und strukturell
verwandte Substanzen

verfasst von | submitted by

Heba Youssef BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

Assoz. Prof. Mag. Dr. Johannes Kirchmair

Danksagung:

Als allererstes möchte ich meinen Supervisor Assoz. Prof. Mag. Dr. Johannes Kirchmair, von meinem ganzen Herzen danken, da er mir die Möglichkeit gegeben hat, Teil seiner Forschungsgruppe zu sein und meine Masterarbeit unter seiner Betreuung zu schreiben. Seine Unterstützung und sein Vertrauen bedeuten mir sehr viel und haben dazu beigetragen, dass ich wachsen und mich in meiner Arbeit weiterentwickeln konnte. Ein großes Dankeschön dafür.

Prof. Kirchmair hat mich von Anfang an unterstützt. Er war stets bereit, mir zuzuhören und sowohl bei meiner Masterarbeit als auch bei persönlichen Lebensproblemen zu helfen. Er hat mich immer verstanden, Lösungen vorgeschlagen und mir gegeben. Das Wort "Danke" reicht wirklich nicht aus, um ihm angemessen zu danken. Ich bin sehr dankbar und wirklich froh, dass ich ihn kennengelernt habe.

Ich möchte auch der gesamten COMP3D danken, insbesondere meiner Kollegin Ya Chen, die immer bereit war, mir zu helfen und mich zu unterstützen. Ihre Großzügigkeit und Unterstützung haben einen großen Unterschied gemacht und haben mir geholfen, mich in meiner Arbeit wohlfühlen. Schließlich möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern, meinen Brüdern und meinem Mann danken. Ohne ihre Unterstützung und Begleitung während meines gesamten Studiums hätte ich es nicht so weit geschafft. Ihre Liebe und Ermutigung haben mir stets Rückhalt gegeben. Sie haben immer an mich geglaubt und alles getan, um meinen Traum zu verwirklichen. Ihre bedingungslose Unterstützung bedeutet mir alles.

Zusammenfassung:

Die computergestützte Strukturanalyse stellt ein unverzichtbares Werkzeug für die Erforschung der Bindungsmechanismen von Proteinen und Molekülen sowie für die Optimierung von Liganden dar. Visualisierungen und Docken von Molekülen können Zeit, Ressourcen und Kosten in der Forschung reduzieren, indem sie vorab die potenziellen Liganden identifizieren, ihre Bindungsaffinität einschätzen und mögliche Optimierungen der Bindungseigenschaften vorhersagen.

In dieser Arbeit werden mithilfe von computergestützten Strukturanalysen verschiedene Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersucht, beschrieben und optimiert. Mehrere Themen wurden behandelt, die alle einen gemeinsamen Schwerpunkt haben, nämlich den Retinsäurerezeptor-verwandten Orphan-Rezeptor ROR γ . Der erste Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit der Beschreibung von ROR γ und seiner Funktion im menschlichen Körper sowie mit einer Literaturübersicht über die bekannten Agonisten, inversen Agonisten und Antagonisten. Im zweiten Abschnitt folgt eine Analyse der Proteinstrukturen, während im letzten Teil Moleküle gedockt wurden, die möglicherweise als inverse Agonisten fungieren.

Im Verlauf dieser Studie haben wir festgestellt, dass Steroide und Flavonoide die am besten geeigneten Liganden für ROR γ sind. Einige dieser Strukturen wurden auch im Labor getestet und erwiesen sich als aktiv, darunter Oleonolic acid 1, IMNA 1 usw. Die übrigen Verbindungen zeigten nach dem Docking-Score ebenfalls Aktivität, was ein vielversprechendes Zeichen für die Durchführung weiterer Experimente darstellt. Es wurde eine neue Serie von Liganden synthetisiert, nämlich Compound 15 bis 15.4, die höchstwahrscheinlich in Zukunft zur Entwicklung neuer Medikamente oder Synthese neuer Liganden beitragen werden.

Abstract:

The computer-assisted structural analysis represents an indispensable tool for investigating the binding mechanisms of proteins and molecules as well as for optimizing ligands. Visualizations and docking of molecules can reduce time, resources, and costs in research by pre-identifying potential ligands, assessing their binding affinity, and predicting possible optimizations of binding properties. This work explores, describes, and optimizes various protein-ligand interactions using computer-assisted structural analyses. Several topics have been addressed, all with a common focus on the retinoic acid receptor-related orphan receptor ROR γ . The first section of the work deals with the description of ROR γ and its function in the human body, as well as with a literature review of the known agonists, inverse agonists, and antagonists. The second section follows an analysis of protein structures, while in the final part, molecules potentially acting as inverse agonists were docked. Throughout this study, it was found that steroids and flavonoids are the most suitable ligands for ROR-gamma. Some of these structures were also tested in the laboratory and proved to be active, including Oleonolic acid 1, IMNA 1, etc. The remaining compounds also showed activity based on the docking score, which is a promising sign for further experimentation. A new series of ligands was synthesized, namely Compound 15 to 15.4, which are likely to contribute to the development of new drugs or the synthesis of new ligands in the future.

1 Einleitung:	2
1.1 Physiologische und medizinische Relevanz von ROR γ t:	2
1.2 Zusammenhänge zwischen RORγt, IL-17 und Entzündung:	3
1.3 RORγ-Struktur:	4
1.4 Computerbasierte Methoden:	10
1.4.1 Computergeschützte Programme und die Möglichkeit der Strukturanalyse:	10
1.4.2 Docking:	11
2 .Methoden:	12
Für die Visualisierung und die Vorbereitung der Protein- und Ligandenstrukturen, sowie des Dockings wurde die Schrödinger Plattform 13.7 verwendet:	12
2.1 1. Protein Preparation:	12
2.3 3. Ligand Preparation:	13
2.4 4. Receptor grid generation:	13
2.5 5. Docking with Glide:	14
3 Analyse der bekannten RORγ-Liganden:	14
3.1 Agonisten:	14
3.1.1 Synthetische Stoffe als Agonisten:	14
3.1.2 Naturstoffe als Agonisten:	15
3.1.3 Analyse der Chemischen Strukturen der Naturstoffe:	22
3.2 Inverse Agonisten:	23
3.2.1 Synthetische Stoffe als inverse Agonisten:	24
3.2.2 Naturstoffe als inverse Agonisten:	26
3.2.3 Analyse der chemischen Struktur der Naturstoffe:	32
3.2.4 ROR γ -Antagonisten:	33
4 Strukturanalyse von Steroiden und strukturell verwandeten Substanzen:	35
4.1 Analysieren der PDB-Struktur:	35
4.1.1 Agonisten:	35
4.1.2 Inverse Agonisten:	39
4.2. Oleanolic bzw. Oleanolsäure und seine Derivate:	49
4.3. IMNA (24Z-Isomasticadienocid) und seine Derivate:	55
4.4. Betulinsäure-Derivate:	61

Abbreviations:

ROR: Die Retinsäurerezeptor-verwandten Orphan Rezeptoren.

CD4+-Zellen: sind T-Helferzellen, die das Merkmal CD4 tragen.

IL: Interleukin.

TH17: spezielle Subgruppe der T-Helferzellen.

AF: Aktivierungsfaktor.

LBD: Ligandenbindungsdomäne.

DBD: DNA-Bindungsdomäne.

RORE: ROR response elements.

H: Helices.

Arg: Arginin.

His: Histidin.

Tyr: Tyrosin.

Phe: Phenylalanin.

Gln: Glutamin.

Trp: Tryptophan.

Leu: Leucin.

CADD: Computer-aided drug design.

SBDD: Strukturbasiertes Wirkstoffdesign.

LBDD: Ligandenbasiertes Wirkstoffdesign.

SAR: Structur activity relationship.

PDB: Protein data bank

DB: Doppelbindung.

UA: Ursolsäure.

Analyse der Modulation von ROR-gamma durch Steroide und strukturell verwandte Substanzen

1 Einleitung

Die Retinsäurerezeptor-verwandten Orphan Rezeptoren $\text{ROR}\gamma$, $\text{ROR}\alpha$ und $\text{ROR}\beta$ sind Transkriptionsfaktoren, die gemeinsam eine Untergruppe der Nuklein Rezeptor-Superfamilie von Transkriptionsfaktoren bilden (RORs).

$\text{ROR}\gamma$ hat 2 Isoformen: $\text{ROR}\gamma_1$ ($\text{ROR}\gamma$) und $\text{ROR}\gamma_2$ ($\text{ROR}\gamma_t$). Die Expression der beiden Isoformen im Organismen ist unterschiedlich: Während $\text{ROR}\gamma$ vorwiegend in der Leber, Niere, Lunge und in den Muskeln nachgewiesen wird, wird $\text{ROR}\gamma_t$ in vielen verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert.

1.1 Physiologische und medizinische Relevanz von $\text{ROR}\gamma_t$

$\text{ROR}\gamma_t$ spielt eine besondere Rolle bei den wichtigen physiologischen Prozessen im Körper und ist in der Lage naive CD4^+ -T-Zellen in proinflammatorische T-Helfer-17-Zellen zu differenzieren und daher stellt er attraktive therapeutische Ziele für Stoffwechsel- und Autoimmunerkrankungen dar [1].

Das proinflammatorische Zytokin IL-17 ist an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie Psoriasis, Psoriasis-Arthritis, Multipler Sklerose, Asthma, Morbus Crohn und ankylosierender Spondylitis beteiligt.

Monoklonale Antikörper gegen IL-17 werden erfolgreich bei der Therapie von Psoriasis eingesetzt, wie z.B. Brodalumab, aber sind gegen andere entzündliche Krankheiten nicht wirksam. Der Grund für die Unwirksamkeit könnte sein, dass bei einigen Erkrankungen die TH17-Zellen anstatt IL-17 Interferon-gamma produzieren. Daher müssen andere therapeutische Wege erkundet werden.

Viele Studien haben gezeigt, dass ROR γ t auch eine konstruktive Rolle bei der Tumorentstehung und Tumorprogression spielt. Ob der Effekt auf die Entstehung von Tumorzellen positiv oder negativ ist, ist bis jetzt nicht deutlich geklärt [2].

Wie bereits erwähnt, ist ROR γ t ein neues therapeutisches Zielprotein für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

Der Transkriptionsfaktor ist auch in Abwesenheit von Liganden ein Transkriptionsfaktor, daher können die auf ROR γ t wirkenden Substanzen nicht nur als Agonisten und Antagonisten, sondern auch als inverse Agonisten wirken.

In dieser Arbeit berichte ich über die Agonisten und inverse Agonisten von ROR γ t und die Bindungspositionen der Liganden in der Bindetasche des Proteins.

1.2 Zusammenhänge zwischen ROR γ t, IL-17 und Entzündung

Th1-, Th2-Zellen und deren Untergruppen, wie Th17, sind die wichtigsten pathogenen Faktoren in den entzündlichen Erkrankungen. Th17-Zellen und deren Zytokin IL-17 spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen bzw. Autoimmunkrankheiten, wie zb. Psoriasis, Multiple Sklerose, Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis und allergisches Asthma und bei allen diesen Krankheiten beobachtet man eine hohe Spiegel von TH17 und IL-17 [3].

Entzündungsreaktionen werden bemerkenswerterweise durch die Zytokine IL-17A/IL-17F induziert, die hauptsächlich von Th17 ausgeschieden werden, was in der Folge die Freisetzung von Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktoren und C-X-C-Motiv (CXC)-Chemokinen induziert [4].

Der wichtigste Transkriptionsfaktor, der in all diesen Zelluntergruppen mit IL-17 assoziiert ist, ist ROR γ t.

ROR α und ROR γ t sind notwendig für die Th17-Differenzierung, außerdem induzieren sie gemeinsam mit p-STAT3 die Expression von Th17-assoziierten Zytokine, wie IL-17A, IL-17F, IL 21, IL-22 und IL-23 [5].

Da es einen Zusammenhang zwischen ROR γ t und Th17-Differenzierung gibt, scheinen niedermolekulare Medikamente bzw. Substanzen, die hemmend auf ROR γ t wirken, ein interessantes Entwicklungsziel zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen.

Zwei Arten von niedermolekularen Inhibitoren wurden entwickelt, um ROR γ t zu adressieren: **inverse Agonisten und Antagonisten**, die beide die ROR γ t-Funktion und die Th17-vermittelte Entzündung modulieren. Damit wird ROR γ t zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel für die Therapie von Th17-induzierten Erkrankungen.

1.3 ROR γ -Struktur

ROR γ -Struktur besteht aus Domänen, die für die Aktivität und die Funktion essentiell sind und die sind : die variable N-Terminale Domäne (A/B mit Aktivierungsfaktor AF2), danach folgt DBD (konservative DNA-bindende Domäne), eine Scharnierregion und ganz am Ende kommt eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD) mit ligandenabhängige Aktivierungsfunktion 2 (AF2).

Die wichtigste und am besten konservierte Domäne ist die DBD, die zwei Zinkfinger-Motive hat, welche die Bindung an die Antwortelemente ROREs (ROR response elements) gewährleistet. Die Scharnierregion ist ein Linker, welche DBD mit LBD verbindet.

ROR γ t bindet als Monomer an die DNA, konkret, an ROREs, die ein einzelnes Kernmotiv mit 5'-AGGTCA-3' enthalten. Die flexible Länge der A/B-Domäne hilft DBD, spezifische DNA-Sequenzen zu erkennen und zu binden, um die Genexpression zu regulieren.

Die LBD besteht aus 12 kationischen Alpha-Helix (H1-H12) und noch zusätzlich zwei Helices (H2' und H11'), die Ligandenbindungsstellen enthalten. Alle Helices bilden gemeinsam einen hydrophoben Hohlraum, an den die Liganden binden können. Wie der Name sagt, ist diese Domäne für die Ligandenbindung zuständig.

AF2 befindet sich in H12 und bildet die Oberfläche von LBD, wo die Co-Aktivatoren und CO-Repressorproteine interagieren.

AF2 ist an der Rekrutierung von Co-Regulatoren und somit direkt an der Kontrolle der ROR γ -Transkriptionsaktivität beteiligt (Abbildung 1).

Wie Agonisten und inverse Agonisten an ROR γ t binden und wirken, wird in den darauffolgenden Sätzen beschrieben.

ROR γ -Agonisten führen zur Konformationsänderung und zur Stabilisierung von H12, infolgedessen kommt es zur vermehrten Produktion und Freisetzung von IL-17.

Inverse Agonisten dagegen unterdrücken die Produktion von Il-17 , indem Sie entweder die Rekrutierung von Koaktivatoren hemmen oder die Rekrutierung von Kernrepressoren verstärken und zeigen daher einen positiven Effekt bei der Behandlung von inflammatorischen Krankheiten.

Was besonders interessant an dem Rezeptor ist, sind zwei Bindungsstellen, eine davon heißt die allosterische Bindungsstelle und die andere wird als orthostatische Bindungsstelle bezeichnet.

Die orthostatische Bindungsstelle ist einfach eine Tasche, die aus der Helixe 3, 5, 6,7,11,12 besteht bzw. gebildet wird.

Dieser Tasche ist besonders wichtig für die Wirkung von den Liganden an ROR γ und die enthält drei Funktionsbereiche und die sind:

1. Der Sulfat-Bereich (sulfate area): Dieser Bereich befindet sich in der Nähe von Arg 367, in diesem Bereich sind die Wasserstoffbrücken zwischen den Verbindungen und die hydrophilen Resten zu sehen.
2. Der hintere Bereich (back area) : Dieser Bereich liegt in der Nähe von Ser 404.
3. Der dritte Bereich: Dieser Bereich heißt Business End und ist aus His 479 und Tyr 502 gebildet, hier können Agonisten und inverse Agonisten in verschiedenen Formen binden und was noch zu erwähnen ist, ist dass diese zwei Aminosäuren einen Teil von dem Agonistensperre sind [5].

Die allosterische Bindungsstelle ist kleiner als die orthosterische Bindungsstelle und ist aus der Helixe 3, 4, 5, 11, 12 gebildet und liegt näher an H12.

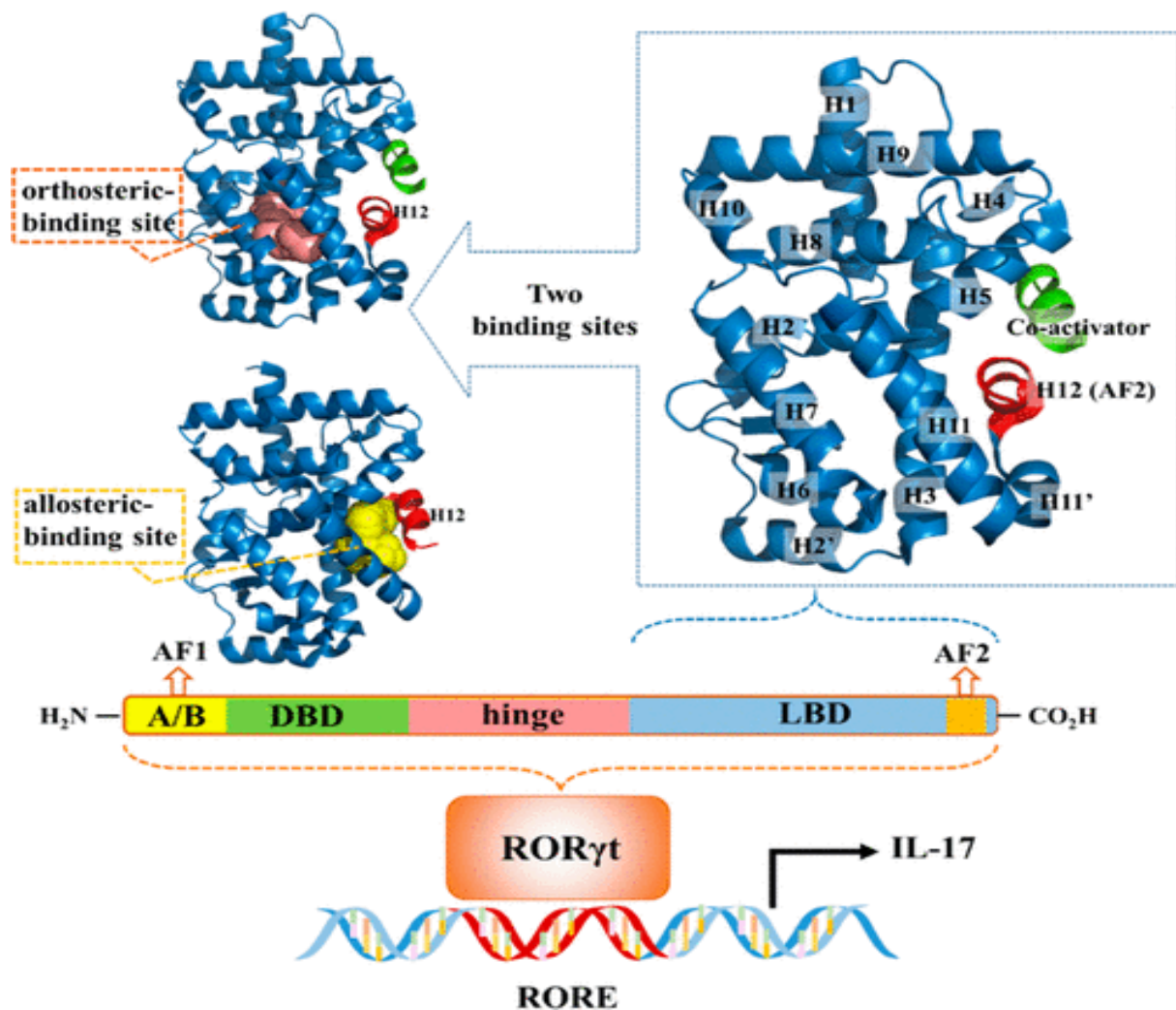


Abbildung 1.: Überblick über die RORγt-Struktur. Quelle: [5]

Die agonistische Sperre:

Die agonistische Sperre besteht aus den Aminosäuren His 479, Tyr 502 und Phe 506 und ist das aktive Zentrum des RORγt-LBDs, wo sich die Agonisten und inverse Agonisten binden (Abbildung 2).

Die agonistische Sperre hat eine entscheidende Bedeutung bei der Bindung von Agonisten und Inverse Agonisten sowohl an der allosterischen, als auch an der orthostatischen Bindungsstelle.

Wie oben geschrieben ist , gehören His 479 und Tyr 502 zu dem Business End.

Die Aminosäuren gehen Interaktionen miteinander ein, und zwar bildet His 479 π - π -Wechselwirkung mit Tyr 502 und Phe 502 (auf H12), außerdem bildet die Aminosäure His479 Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr 502.

Agonisten führen zur Stabilisierung der agonistischen Sperre des ROR γ t-Rezeptors und helfen ihm dabei, die Transkription des Zielgens zu induzieren.

Die inverse Agonisten hingegen stören die Sperre und richten H12 in eine andere Richtung und so ist ROR γ nicht mehr fähig, die Transkription von den Zielgenen zu induzieren.

Zusammenfassend: Die agonistische Sperre ist ein Schlüsselement für die Kontrolle und Aktivität von Agonisten und Inverse Agonisten.

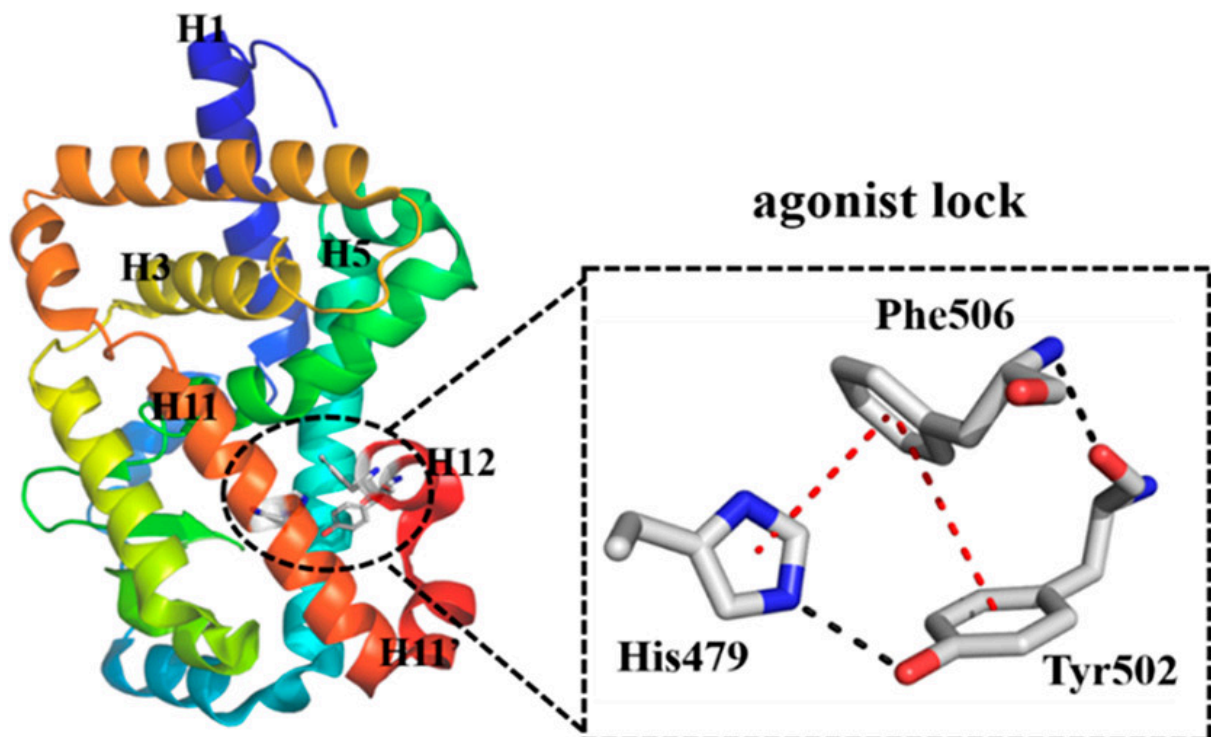


Abbildung 2.: ROR γ -Agonistensperre. Quelle: [6]

Da die Inverse Agonisten die Agonistensperre direkt oder indirekt aufbrechen können, werden Sie in zwei Klassen klassifiziert, die Inverse Agonisten, die zu der ersten Klasse gehören, heißen “agonist lock touched inverse agonists”, während die anderen als “agonist lock untouched inverse agonists” bezeichnet werden (Abbildung 3).

Agonist lock touched inverse agonists stehen in direktem Kontakt mit der Sperre und können die Sperre direkt aufbrechen oder sie bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit His 479, Tyr 502 und Phe 506.

Agonist lock touched inverse agonists zwingen His 479 und die korrelativen Reste eine andere Konformation aufzunehmen und dieser Mechanismus heißt Push-Pull-Mechanismus.

Agonist lock untouched inverse agonists wirken indirekt auf His 478-Tyr 502-Phe 506, indem sie die Bewegung von Leu 324, Met 358, Trp 317 auslösen und das geschieht durch das Einfangen vom Wassermolekül. [6]

Das gefangene Wassermolekül geht Wasserstoffbrückenbindungen mit Tyr 502 ein und so wird das Wassermolekül leicht in das Lösungsmittel freigesetzt, wobei Tyr 502 entfernt wird und es zur Destabilisierung von AF2 kommt.

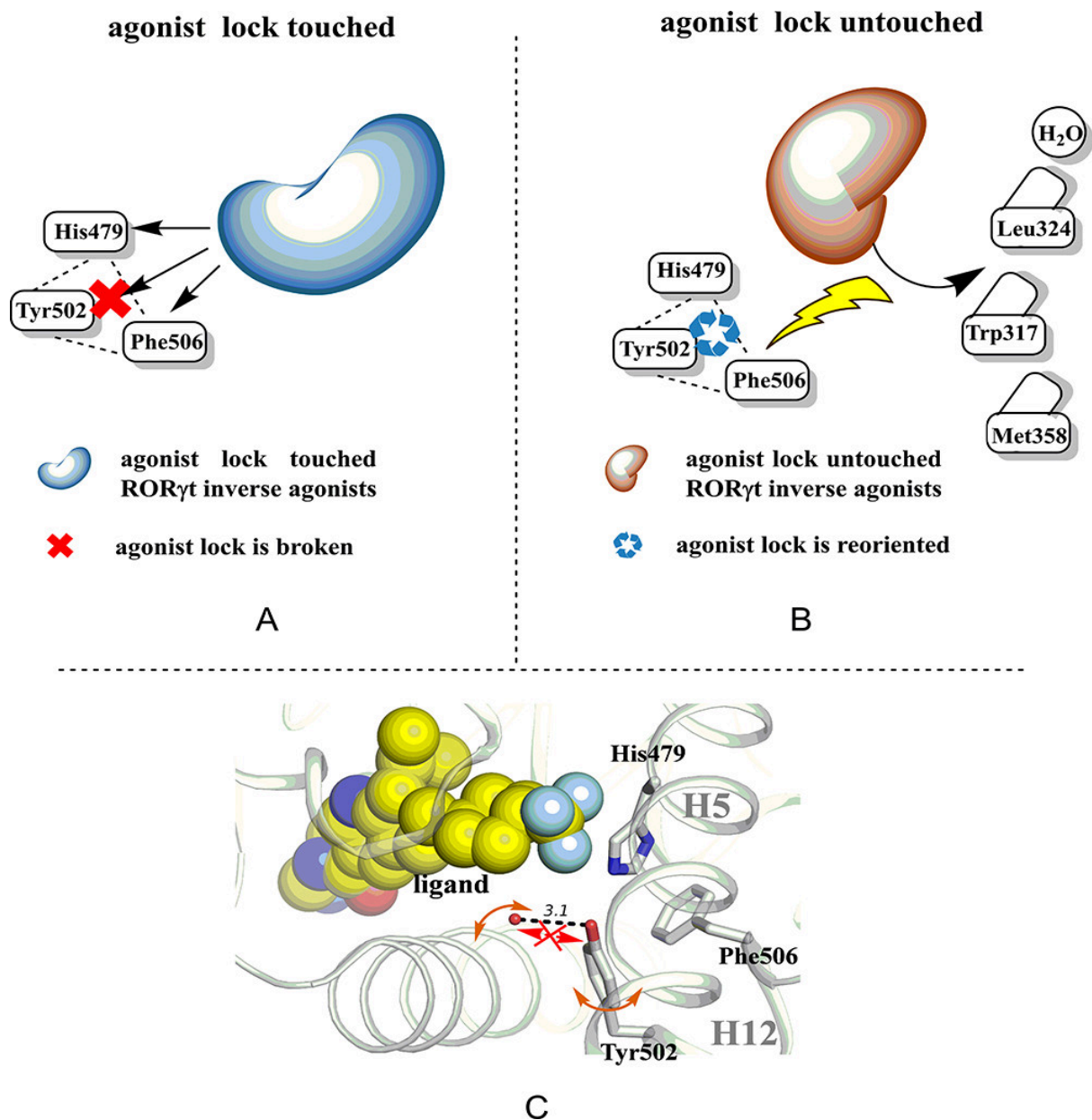


Abbildung 3: A- Agonistensperre berührte Inverse Agonisten, B- Agonistensperre unberührte Inverse Agonisten, C- Die schematische Darstellung des Wasserfang-Mechanismus. Quelle: [6]

1.4 Computerbasierte Methoden

Die computergeschützte Strukturanalyse ist heutzutage ein sehr wichtiges Werkzeug für moderne Protein-Molekül-Bindungsmechanismen und Ligandoptimierung.

Bei der Suche nach neuen Liganden für bestimmten Zielproteine oder Optimierung oder Verbesserung von vorhandenen Substanzen sind diese Art von der Visualisierungen und Andocken von Liganden besonders hilfreich, da es bevor die Forschungen oder Entwicklungen durchgeführt werden, kann schon herausgefunden werden, welche Verbindungen als Liganden in Frage kommen und ihren Bindungsaffinität zu der Zielstruktur kann auch bestimmt werden und in dieser Weise werden schon Zeit und Ressourcen gespart.

In der Arbeit wird über ein paar Strukturen, spezifisch Steroide und strukturverwandete Substanzen, deren Bindungsaffinität, Docking Score, Bindungsweise in der Bindetasche usw. berichtet.

1.4.1 Computergeschützte Programme und die Möglichkeit der Strukturanalyse

Computer-aided drug design (CADD) steht für Computerwerkzeuge und Ressourcen für die Speicherung, Verwaltung, Analyse und Modellierung von Verbindungen.

Der Begriff umfasst die Entwicklung digitaler Methoden zur Untersuchung von chemischen Wechselwirkungsbeziehungen, Computerprogramme für das Design von Verbindungen mit interessanten chemischen-physikalischen Eigenschaften, sowie Werkzeuge zur systematischen Bewertungen potenzieller Leitkandidaten, bevor sie hergestellt und getestet werden [7].

Strukturbasiertes Wirkstoffdesign (SBDD) und ligandenbasiertes Wirkstoffdesign (LBDD) sind zwei Methoden, die häufig in der computergestützten Arzneimittelentwicklung verwendet werden.

Bei SBDD bzw. Structure-based drug design werden dreidimensionale Strukturinformationen analysiert und bei LBDD bzw. ligand-based drug design liegt der Schwerpunkt auf der Herstellung einer Beziehung zwischen ihren physikalischen-chemischen Eigenschaften und

ihren Aktivität, das wird auch als Struktur-Aktivitäts-Beziehung bzw. structur-activity-relationship (SAR) bezeichnet.

Bevor man die Beziehungsart zwischen Struktur und Aktivität einer Verbindung sagen kann, wird die Struktur für SAR in Form von 3D-Struktur von Makromolekülen benötigt.

Protein-Data-Bank (PDB) ist eine Plattform, bei der man die Proteinstrukturen in 3D-Form exportieren kann [8].

Die 3D-Struktur der Proteinen wird meistens mittels Röntgenkristallographie (X-ray crystallography), Kernspinresonanz (NMR) oder Kryo Elektronenmikroskopie (EM) gewonnen [9].

Computergeschützte Programme haben bei der Entdeckung, Optimierung und Gestaltung von ROR-Modulatoren eine wichtige Rolle gespielt.

1.4.2 Docking

Molekulares Docking ist heutzutage eine der bekanntesten SBDD-Methoden (struktur-based drug design), die darauf abzielt, die möglichen Bindungsmodi und Affinität einer Verbindung bzw. kleiner Moleküle an einem bestimmten Zielprotein innerhalb seiner Bindetasche basierend auf seiner Konformation und Komplementarität mit den Merkmalen der Bindetasche [8] [10].

Die Verbindungen werden nach dem Docking in Gruppen oder Reihen eingestuft, je nach ihrem Docking-Score und das eine entscheidender Schritt beim virtuellen Screening. Was noch zu bedenken ist, dass hohe Docking Score kein Beweis für tatsächliche Bindung sind, es kann sein, dass der Score hoch ist, aber in der Realität keine Aktivität von dem Ligand nachgewiesen werden kann.

Das Docking bzw. die Dockingsergebnisse dienen nur als Anhaltspunkt dafür, welche Bindungsposen möglich sein könnten und wie ein Stoff an das Zielprotein binden kann [8].

Docking kann man in zwei Gruppen unterteilen und zwar: Rigid Docking und Flexible Docking.

Bei Rigid Docking wird der Ligand ohne Konformationserzeugung an der Bindungsstelle relativ gedreht, aber bei Flexible Docking werden Konformations-, Orientierungs- und Position Freiheitsgrade der Liganden vom Docking-Tool abgetastet [11].

Es gibt verschiedene Tools fürs Docking und in dieser Arbeit wurde das Flexible Docking mit Glide verwendet.

Glide ist ein integriertes Tool, das zur Schrödinger-Plattform gehört.

2 .Methoden

Für die Visualisierung und die Vorbereitung der Protein- und Ligandenstrukturen, sowie des Dockings wurde die Schrödinger Plattform 13.7 verwendet.

2.1 Protein Preparation

Zuerst wird das Zielprotein aus PDB importiert und mit der Hilfe von Protein Preparation Wizard vorbereitet. Für die korrekte Vorbereitung sind 3 Schritte zu folgen: Vorverarbeitung, Optimierung und Minimierung.

Um ein Protein vorzuverarbeiten müssen folgende Prozesse durchlaufen werden:

- Zuweisung von Atom- und Bindungstypen mithilfe der CCD-Datenbank.
- Wasserstoffe hinzufügen
- Zuweisung von Bindungen zu Metallen
- Erstellung von Disulfidbindungen
- Ergänzung fehlender Seitenketten mit Prime (Teil der Schrödinger Plattform)
- Erzeugen der Het-Zustände mit Epik (Teil der Schrödinger Plattform) bei einem pH-Wert von 7,0 +/- 2,0

Zu diesem Zeitpunkt können sich einzelne Atome der Proteinstruktur überlappen. Diese Fehler wurden durch die Optimierung der Proteinstruktur behoben.

Um die Proteinstruktur weiter zu optimieren, wurden Wasserstoffbrückenbindungen wie folgt zugeordnet:

- Die Wassermoleküle wurden in ihrer Ausrichtung optimiert
- Ein PROPKA-pH-Wert von 7,0 wurde für die Berechnung der Protonierungszustände verwendet

Die Struktur wurde mittels OPLS4-Kraftfeld minimiert und schwere Atome auf einem RMSD von 0,30 Å konvergiert.

2.2 Ligand Preparation

Zur Ligandenvorbereitung wurde LigPrep verwendet. Das verwendete Kraftfeld war OPLS4. Für die Ionisierung wurde die Erzeugung möglicher Zustände bei einem Ziel-PH-Wert von 7,0 +/- 2,0 mit Epik gewählt. Darüber hinaus wurden die Strukturen entsalzt und Tautomere erzeugt. Spezifizierte Chiralitäten wurden beibehalten und andere Chiralitätszentren variiert. Für jeden Liganden wurden maximal 5 Stereoisomere erstellt.

2.3 Receptor grid generation

Für die Receptor Grid Generation wurde der co-kristallisierte Ligand mit dem in Maestro integrierten Receptor Grid Generation Tool ausgewählt. Für die Van-der-Waals-Radius-Skalierung wurde der Standard-Skalierungsfaktor (Scaling factor) mit 1,0 und der Teilladung Grenzwert (partial charge cutoff) von 0,25 gewählt. Die umschließende Box wurde auf den Schwerpunkt des co-kristallisierten Liganden eingestellt. Als Größe wurden „Dockliganden ähnlicher Größe wie der Arbeitsbereichsligand“ gewählt. Es wurden keine weiteren Einschränkungen gesetzt.

2.4 Docking with Glide

Zum Andocken wurde das integrierte Ligand Docking Tool von Glide verwendet. Das Receptor Grid wurde aus „Datei“ ausgewählt bzw. importiert. Es wurde die Standardpräzision (SP) gewählt und die Ligandenprobenahme auf „flexibel“ eingestellt. Eine Post-Docking-Minimierung wurde durchgeführt, und es wurden 10 Posen pro Ligand ausgewählt.. Weitere Einschränkungen wurden nicht festgestellt bzw. eingelegt.

3. Analyse der bekannten ROR γ -Liganden

Bei der Suche nach Substanzen, die ROR γ modulieren können, wurden drei verschiedene Arten von Liganden identifiziert: Agonisten, inverse Agonisten und Antagonisten. Diese umfassen sowohl synthetische als auch Naturstoffe.

Ein ROR γ -Agonist ist ein Molekül, das die Wechselwirkungen der Ligandenbindungsdomäne (LBD) mit einem oder mehreren Koaktivator-LXXLL-Motiven verstärkt. Diese Motive binden an die LBD und führen zur transkriptionellen Aktivierung, was die Produktion von IL-17 durch ROR γ erhöht [1].

3.1 Agonisten

3.1.1 Synthetische Stoffe als Agonisten

Nach der Entdeckung der ersten natürlichen ROR γ -Modulatoren versuchen Forscher aktiv, neue Verbindungen mit verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften und Selektivitäten zu synthetisieren.

Das Scripps-Forschungsinstitut in Florida veröffentlichte den ersten synthetischen ROR γ -Agonisten, SR1078. In Gal4-Luciferase-Reporterassays zeigte SR1078 eine gewisse Selektivität für ROR γ und ROR α im Vergleich zu FXR, LXR α und LXR β . Seine Aktivität wurde bereits in Mausmodellen untersucht, wobei festgestellt wurde, dass SR1078 die Expression verschiedener Gene erhöht. Dieser Effekt wurde auf den ROR α -Agonismus zurückgeführt, aber zusätzliche synergetische Effekte oder Auswirkungen auf ROR γ sind noch nicht vollständig geklärt [12].

GSK, GNE und AstraZeneca entwickelten einige Serien von ROR γ -Modulatoren, die agonistisch wirken, jedoch durch geringfügige strukturelle Veränderungen einen vollkommen anderen Effekt zeigten (Abbildung 4).

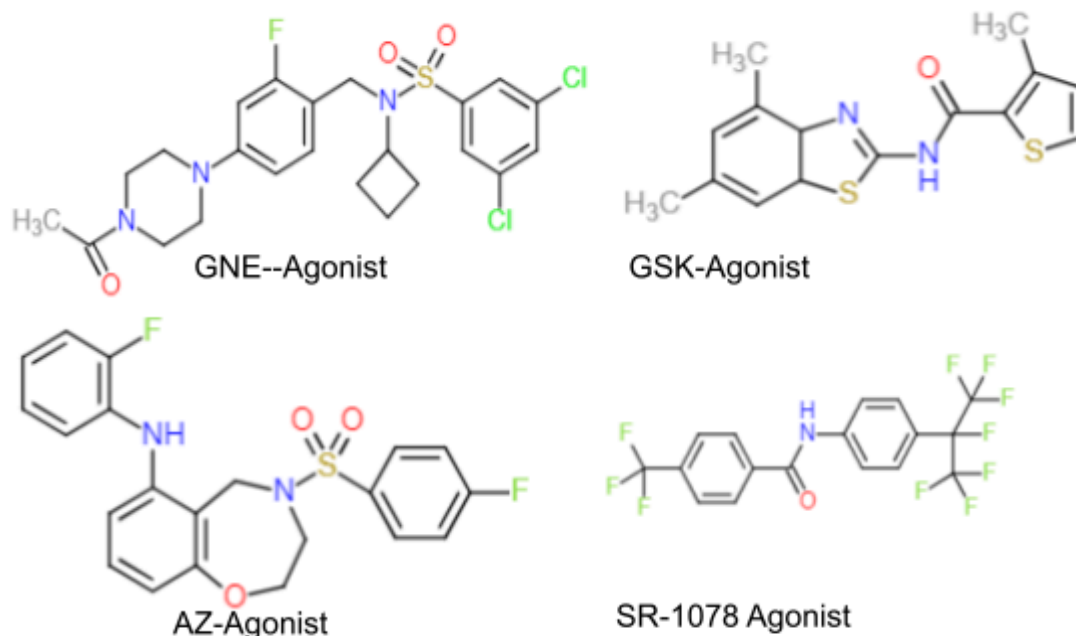


Abbildung 4: Beispiele für synthetische Agonisten.

3.1.2 Naturstoffe als Agonisten

Die Agonisten werden entsprechend ihrer chemischen Struktur, also ihrer Ähnlichkeiten oder gemeinsamen Merkmale, in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dazu gehören Steroide, Terpenoide, Polyketide und Flavonoide.

1.Steroide:

Cholesterin ist ein polyzyklischer Alkohol, der zur Gruppe der Lipide gehört. Es ist der Hauptbestandteil der Zellmembranen und dient als Ausgangsstoff für die Synthese von Gallensäuren und Steroidhormonen.

Tierische Zellen können Cholesterin sowohl endogen, also durch die eigene Synthese, als auch exogen, durch die Nahrungsaufnahme, erhalten. Es ist wichtig, ein Gleichgewicht zwischen der Menge an endogenem und exogenem Cholesterin zu halten, um die schädliche Ansammlung zu verhindern, die zu Gesundheitsproblemen wie Arteriosklerose, Gallensteinen und verschiedenen Lipidstoffwechselerkrankungen führen kann [13].

Die Aktivität von Cholesterin und Hydroxycholesterin auf ROR wurde als erste untersucht. Cholesterin bindet an ROR α , und aufgrund der Sequenzidentität von etwa 46% zwischen

ROR γ und ROR α und ROR β in ihren Ligandenbindungsdomänen (LBDs), wurde bereits untersucht, ob Cholesterin und seine Derivate in der Lage sind, ROR γ zu aktivieren. 25-Hydroxycholesterin stabilisiert indirekt Tyrosin 502 (auf H12) entweder durch eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung oder direkt durch die Hydroxygruppe an Position 25, die eine Wasserstoffbrückenbindung mit Histidin 479 (auf H11) eingeht [14].

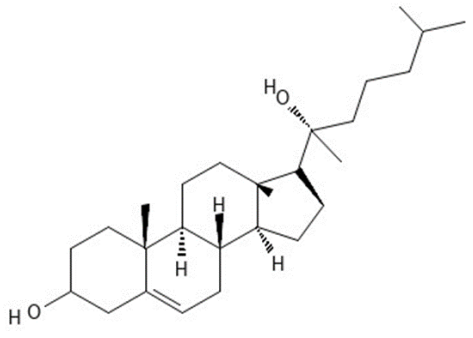
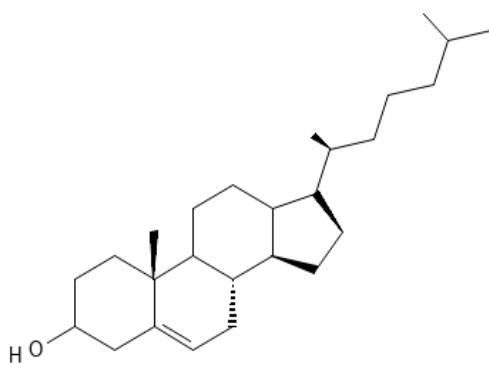
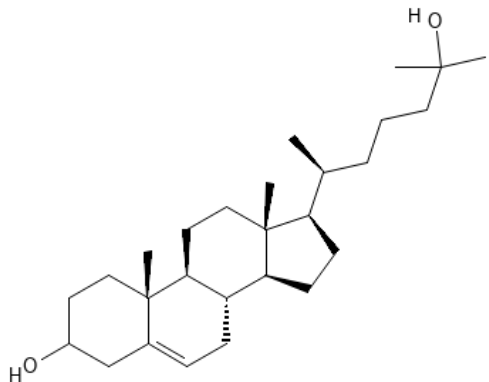
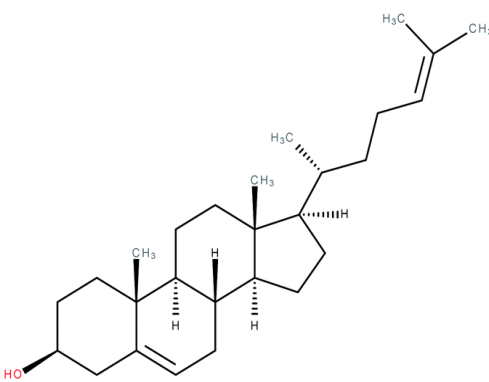
Nach Untersuchungen wurde festgestellt, dass Cholesterin und seine Derivate, wie 20-alpha-, 22-alpha- und 25-alpha-Hydroxycholesterin, die Interaktionen von ROR γ mit verschiedenen Koaktivatoren, darunter LXXLL-Motive wie SRC1-2, SRC1-4 und CBP, verstärken. Dies legt nahe, dass Hydroxycholesterine als Agonisten für ROR γ fungieren. Die Zwischenprodukte und Sterole, die im Cholesterinbiosyntheseweg entstehen, erfüllen somit die Voraussetzungen, um als Agonisten zu wirken.

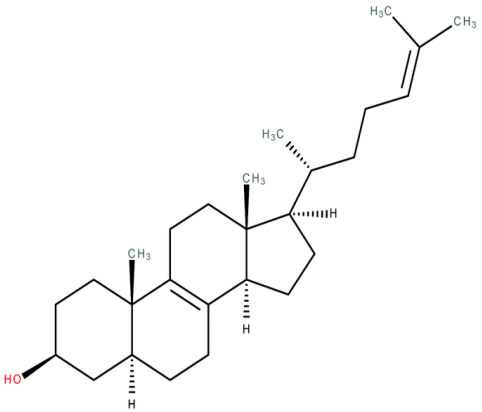
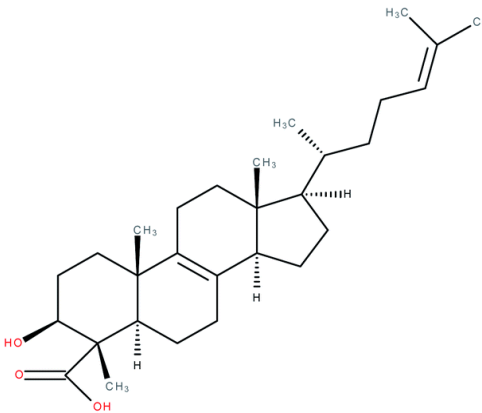
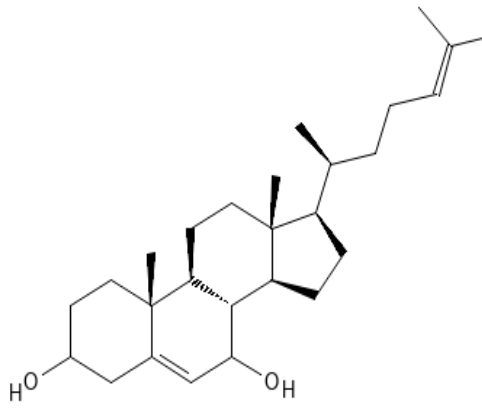
Daher wurde die Aktivität von ROR γ in verschiedenen Säugetierzelllinien wie HEK293T-, Hela- oder HepG2-Zellen untersucht. Diese Zellen wurden in einem cholesterinarmen Medium kultiviert, und dennoch zeigte ROR γ überall Aktivität. Dies unterstützt die Vorstellung, dass eine oder mehrere Metaboliten als Agonisten für ROR γ wirken können.

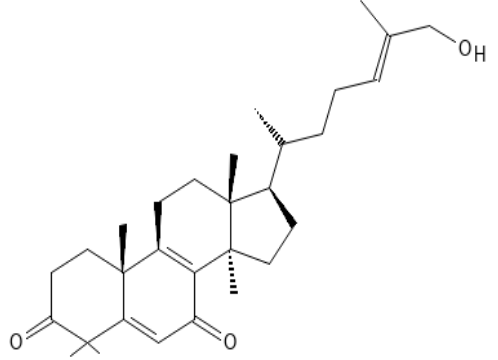
Die Schlussfolgerung lautet: Zymosterol, Desmosterol und Desmosterolsulfat führten zu einer Zunahme der Produktion von IL-17 und fungieren daher als Agonisten für ROR γ [15].

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten ROR γ -Agonisten

	Naturprodukt	Ziel(e)	Struktur
--	--------------	---------	----------

1	20- α -Hydroxy-Cholesterol	ROR γ -Agonist [15].	
2	Cholesterin	ROR- α -Agonist [15].	
3	25-Hydroxycholesterin	ROR γ -Agonist [15].	
4	Desmosterol	ROR γ -Agonist [15].	

5	Zymosterol	ROR γ -Agonist [15].	
6	4 α -Carboxy, 4 β -Methyl-Zymosterol	ROR γ -Agonist [15].	
7	7- α -Hydroxycholesterin	ROR α/γ inverse Agonist [15].	

8	Ganoderon A	ROR γ t-Agonist [15].	
---	-------------	---------------------------------	---

Neoruscogenin ist ein steroidales Saponin, das in *Ruscus aculeatus* vorkommt. Dieser Wirkstoff wurde als hochaffiner und potenter Agonist für ROR-alpha identifiziert. Seine Aktivität in ROR α -Reporterassays sowie seine Wirkung auf die Expression von ROR α -Zielgenen wurden bereits in vivo und in vitro nachgewiesen [16].

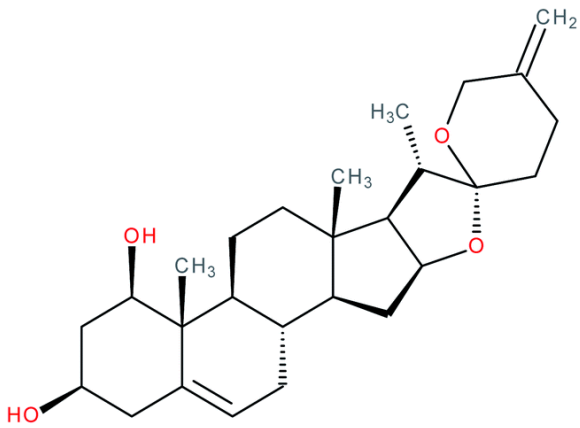
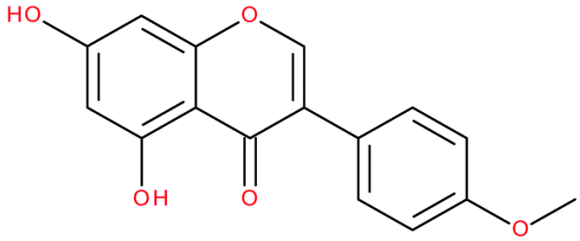
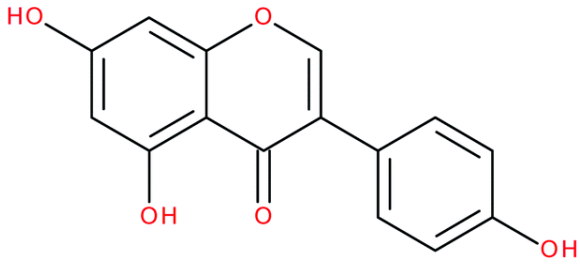
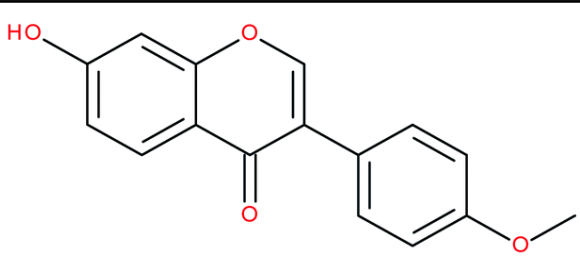
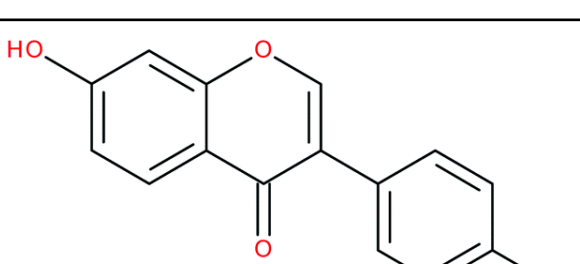
2.Terpenoide:

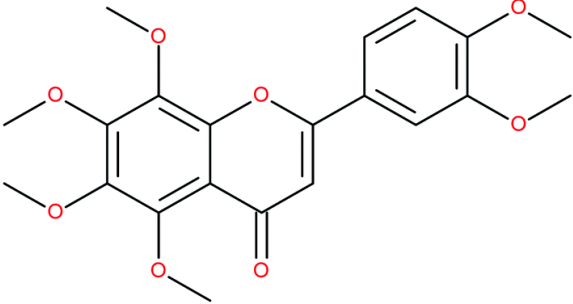
Ganoderon A ist ein Triterpenoid, das aus *Ganoderma pfeifferi* (Ganodermataceae) isoliert wurde. Es wurde als Agonist für ROR γ t identifiziert. Dieser Wirkstoff führt zur Stabilisierung des Rezeptors, indem er die His-Tyr-Sperre unterbricht und zwei Wasserstoffbrücken zwischen dem Wirkstoff und den Helices 11 und 12 etabliert.

3.Polyketide bzw. Flavonoide:

Isoflavone sind Pflanzenteile der Familie Fabaceae. Biochanin A, Genistein, Formononetin und Daidzein wirken als Agonisten, jedoch dosisabhängig und es wurde berichtet, dass diese vier Isoflavone ROR α - und ROR γ vermittelte Transkriptionsaktivität, die Interaktion zwischen dem ROR α - oder ROR γ -LBD, dem Co-Aktivator LXXLL-Peptid EBIP96 und die mRNA-Expression von IL-17A erhöhen [15].

Nobiletin ist ein natürliches Polymethoxyflavonoid, das speziell in Zitruschalen vorkommt. Es zeichnet sich durch das Vorhandensein von sechs Methoxygruppen auf dem Flavongrundgerüst aus, die sich in den Positionen 5, 6, 7, 8 im Ring A und 3', 4' im Ring B befinden [16]. Nobiletin wird derzeit als vielversprechender Entzündungshemmer und Antitumorwirkstoff betrachtet.

9	Neuroscogenin	ROR α -Agonist [15].	
10	Biochanin A	ROR α / γ -Agonist [15].	
11	Genistein	ROR α / γ -Agonist [15].	
12	Formonenetin	ROR α / γ -Agonist [15].	
13	Daidzein	ROR α / γ -Agonist [15].	

14	Nobiletin	ROR α / γ -Agonist [15].	
----	-----------	---	--

3.1.3 Analyse der Chemischen Strukturen der Naturstoffe

Steroide sind Verbindungen mit dem Grundgerüst des Sterans. Zu denen gehören die Sterole bzw. Sterine, Gallensäure, Corticosteroide und Sexualhormone [18].

Steroide sind lipophil und können sich daher sehr gut in Zellmembranen einlagern. In diesem Zusammenhang spielen Sterine, Oxysterine und Secosteroide eine bedeutende Rolle, da sie einen Effekt auf ROR haben.

Sterine bzw. Sterole bestehen aus 27 Kohlenstoffatomen und insgesamt 4 Ringen, wobei drei davon Cyclohexane und der vierte Ring ein Cyclopentan ist. Die Ringe werden üblicherweise mit Buchstaben gekennzeichnet: der erste Ring ist A, daneben B, und die oberen zwei sind C und D. Sterine tragen eine Hydroxylgruppe an Position 3 (C3 im Ring A) und eine Doppelbindung (DB) im Ring B zwischen C5 und C6, wobei eine lange Kohlenstoffkette an Position 17 am Cyclopentan angebracht ist, was das Grundgerüst von Cholesterin bildet.

20-alpha-Hydroxycholesterin besitzt eine zusätzliche Hydroxygruppe an Position 20, während 25-alpha-Hydroxycholesterin eine zusätzliche Hydroxygruppe am C25 hat. Wenn eine Hydroxylgruppe am C7 (Ring B) hinzugefügt wird, entsteht 7-alpha-Hydroxycholesterin, das jedoch als inverser Agonist gilt.

Desmosterol und Zymosterol weisen eine zweite Doppelbindung zwischen C24 und C25 auf. Bei Zymosterol befindet sich die Doppelbindung im Ring B zwischen C8 und C9, während bei 4-alpha-Carboxy-4-beta-Methylzymosterol eine Carbonsäuregruppe am C4 im Ring 4 vorhanden ist.

Ganoderon A weist, wie sein Suffix andeutet, Ketogruppen auf, was auch in seiner chemischen Struktur zu erkennen ist. Es besitzt zwei Ketogruppen bzw. Carbonylgruppen an

C3 und C6. Es unterscheidet sich vom Cholesterin-Grundgerüst auch durch eine Hydroxylgruppe an Position 27 und die Doppelbindung im Ring B verschiebt sich nach oben und befindet sich zwischen C8 und C9. Nobiletin besitzt im Vergleich zu Cholesterin zusätzliche Ringe, darunter einen Oxolanring und eine Hydroxylgruppe im Ring A an Position 1.

3.2 Inverse Agonisten

Seit ROR γ t als potenzielles Angriffsziel für Medikamente bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen identifiziert wurde, sind mehrere ROR γ t-inverse Agonisten in klinische Studien eingetreten. Ein ROR γ t-inverse Agonist ist ein Molekül, das die inaktive Konformation von RORs stabilisiert oder H12 in eine Position bringt, die die Bindungsstelle für Koaktivatoren blockiert, wodurch die Produktion und Freisetzung von IL-17 herabgesetzt oder verhindert wird [1].

Die ROR γ t-inverse Agonisten lassen sich je nach Grundgerüst in verschiedene Gruppen unterteilen. Hier wurde über natürliche und synthetische Liganden berichtet, die als ROR γ t-inverse Agonisten gelten.

3.2.1 Synthetische Stoffe als inverse Agonisten

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Serien von ROR γ -inverse Agonisten identifiziert und veröffentlicht, die sowohl eine Ähnlichkeit in den Bindungsinteraktionen mit RORC aufweisen als auch chemisch ähnlich sind [1]. Verschiedene Teilstrukturen können in diesen inverse Agonisten vorhanden sein, darunter:

- **Sulfonamide**
- **Cyclische Amine**
- **Acyclische Sulfonamide**
- **Sultiamderivate**
- **Arylsulfonylverbindungen**
- **Amid/Bis-amid-Derivate**
- **Hexafluorisopropanol-Phenyllderivate**
- **Carbonylpiperazin/Piperidin-Derivate**
- **2-Chlor-6-fluorbenzamid-Derivate**

Diese Strukturen tragen dazu bei, die Affinität und Wirksamkeit der inverse Agonisten gegenüber ROR γ zu beeinflussen [6] [12].

Derzeit beschäftigen sich Pharmaunternehmen wie GSK, Vitae und Arrien Pharmaceuticals intensiv mit der Entdeckung von ROR-Modulatoren. Zu diesem Zweck führen sie kontinuierlich klinische Studien durch.

Moleküle, die sowohl in vivo als auch in vitro als ROR γ -inverse Agonisten identifiziert wurden, befinden sich in verschiedenen Entwicklungsphasen klinischer Studien. Ein Beispiel hierfür ist VTP-43742 von Vitae Pharmaceuticals Inc., das sich derzeit in Phase 2 der Entwicklung befindet und für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Psoriasis untersucht wird. Darüber hinaus gibt es noch weitere Moleküle und Verbindungen, die ebenfalls in verschiedenen Stadien der klinischen Entwicklung für die Modulation von ROR beschäftigt sind (Einpaar Beispiel sind bei Abbildung 5 zu sehen) [19].

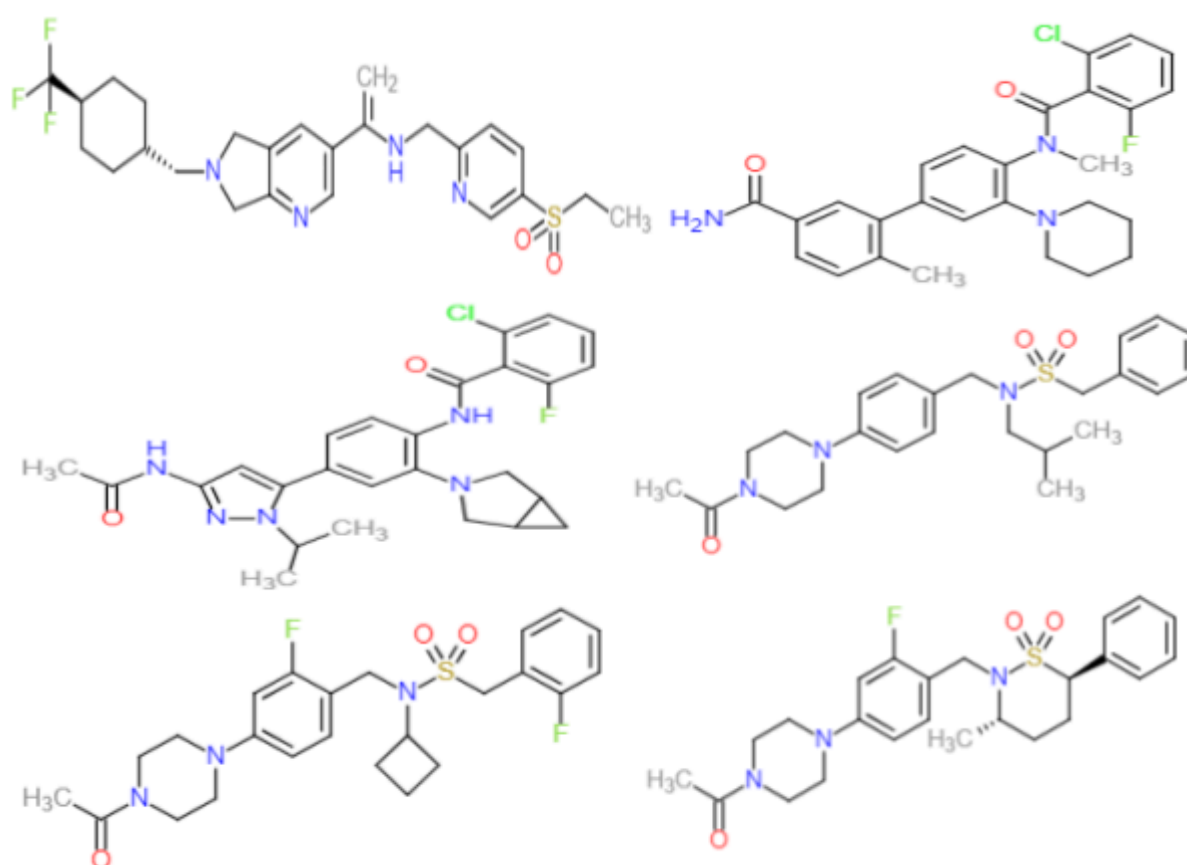


Abbildung 5: Beispiele für ROR γ -inverse-Agonisten.

3.2.2 Naturstoffe als inverse Agonisten

1. Terpenoide:

Ursolsäure (UA) ist ein natürlich vorkommender Ligand, der in vielen Pflanzen und medizinischen Kräutern zu finden ist. Es wurde festgestellt, dass Ursolsäure selektiv ROR γ t hemmt. Ursolsäure gilt als inverser Agonist, da sie die TH17-Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) hemmt und die Expression des IL-17-Gens verringert. Dabei bleibt jedoch die Expression von ROR α / γ t-Genen erhalten.

Die Co-Kristallstruktur von Ursolsäure mit ROR γ -Ligandenbindungsdomäne (LBD) zeigt, dass Ursolsäure eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem Histidinrest eingeht und zu einem Flip der Helix 11 führt. Dadurch wird die Helix 11 näher an Helix 12 herangerückt, was einen ungeordneten C-Terminus verursacht [15].

UA hemmt dosisabhängig die Bindung von ROR γ t-LBD an das LXXLL Co-Aktivator-Peptid, aber es hemmt die Bindung von ROR α -LBD an das Koaktivatorpeptid nicht, was auf seiner ROR γ t-LBD-Selektivität hindeutet [20].

Methylcorosolat, Uvaol und Oleanolsäure sind Naturstoffe, die aus *Eriobotrya japonica* isoliert werden. Chemisch betrachtet handelt es sich um Triterpenoide, die eine hemmende Wirkung auf ROR γ t haben.

Rockogenin ist ein pflanzliches Steroid, das in *Agave-Gracilipes* vorkommt. Es interagiert mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) von ROR γ t über zwei Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte. Dadurch wird die agonistische Sperre unterbrochen. Rockogenin hemmt die Freisetzung von IL-17 in Th17-Zellen und reduziert die ROR γ t-Transaktivierung.

Amethinol A ist ein Diterpen und wurde aus *Isodon amethystoides* isoliert.

Er hat eine hemmende Wirkung auf ROR γ t [15].

Betulinsäure (BA) ist ein natürliches pentazyklisches Triterpenoid, das in vielen Pflanzen vorkommt. Es ist ein äußerst interessanter Wirkstoff aufgrund seiner Vielzahl von biologischen und pharmakologischen Aktivitäten, darunter entzündungshemmende, krebshemmende und HIV-hemmende Aktivitäten.

Betulinsäure kann an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) von ROR γ t binden und gilt als inverser Agonist. Die genauen Interaktionsmechanismen von Betulinsäure mit ROR γ t werden später diskutiert [2].

2. Herzwirksame Glykoside:

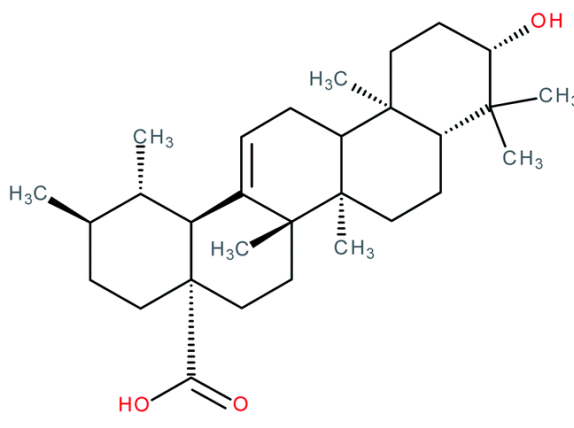
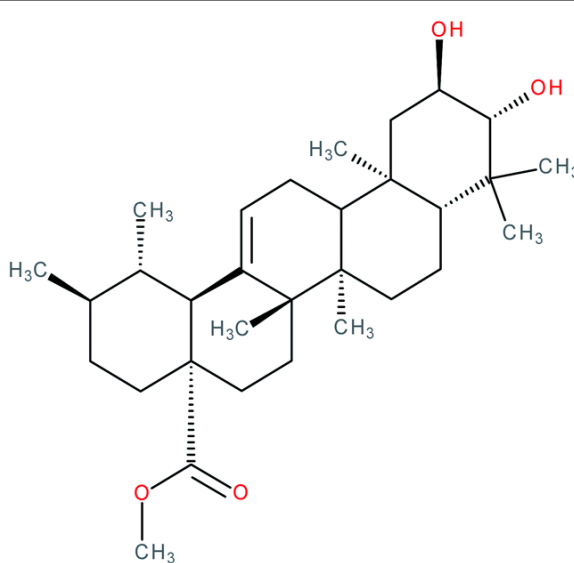
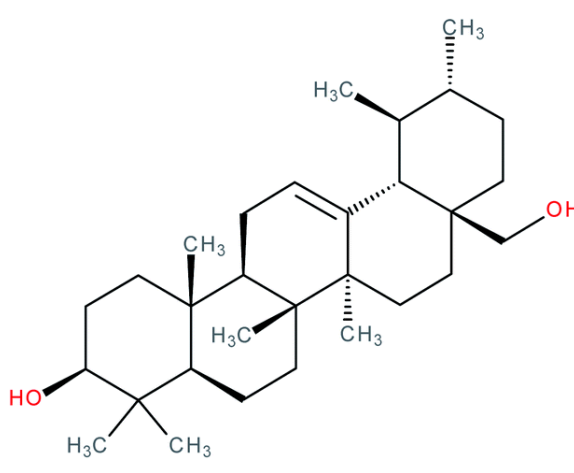
Digoxin und seine Derivate: Digoxin ist ein Cardenolid (Herzwirksames Glykosid) aus *Digitalis lanata* und wirkt als ROR γ inverse Agonist, weil es die Transkriptionsaktivität von ROR γ t sinkt [15].

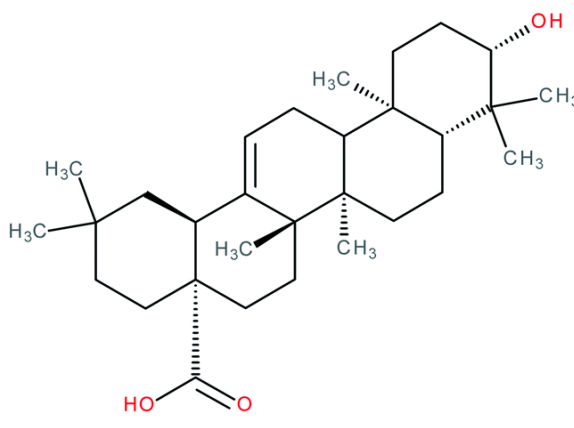
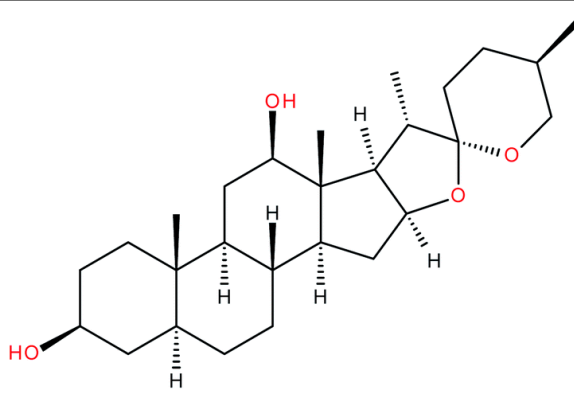
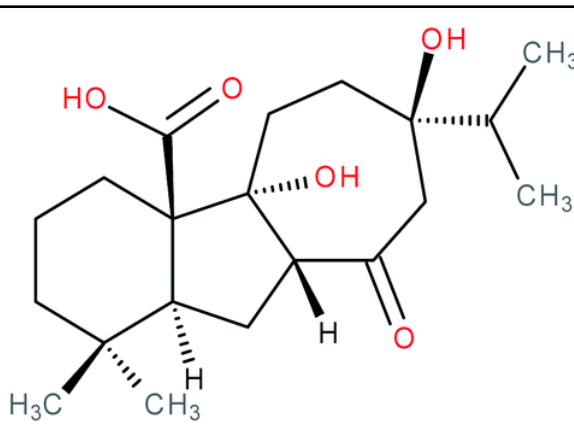
Digoxin hemmt die Produktion von IL-17, indem es die Differenzierung seiner produzierenden Zellen, der sogenannten TH17-Zellen, unterdrückt. Dabei bleibt die Produktion von IL-2 unbeeinflusst. Interessanterweise wird die Bildung von TH1-Zellen und IFN-Gamma während der T-Zell-Differenzierung nicht gehemmt, was auf den selektiven Effekt von Digoxin auf die TH17-Differenzierung hinweist.

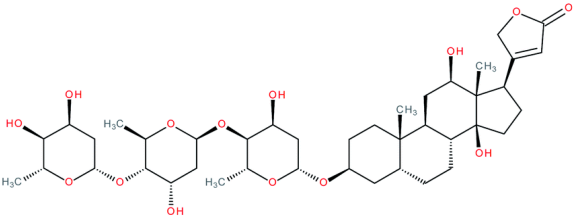
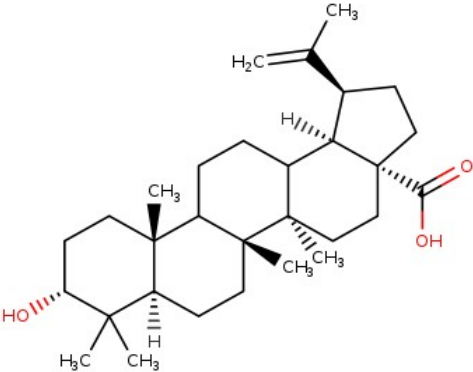
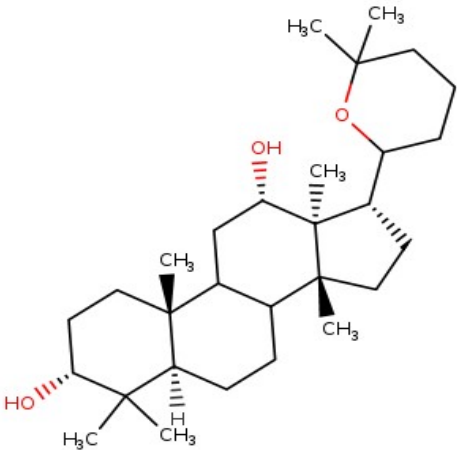
Da ROR γ t als Schlüsselregulator der TH17-Differenzierung bekannt ist, ist es wichtig, die Wirkung von Digoxin auf diesen Regulator zu untersuchen und zu bestätigen. Die Kristallstruktur von Digoxin zeigt, dass es sich effektiv in der Ligandenbindungstasche des ROR γ t-Ligandenbindungsdomäne (LBD) bindet und dadurch die Aktivität von ROR γ t-LBD hemmt [21]. Die antagonistische Wirkung von Digoxin kann auf seine Bindung zwischen den Helices H3 und H11 in der Ligandenbindungstasche von ROR γ t-LBD zurückzuführen sein. Diese Bindung führt zu einer Blockade der helikalen Lokalisierung von H12 in der aktiven Konformation und behindert somit die Bildung von LBD-Koaktivatoren auf räumlicher Ebene [21].

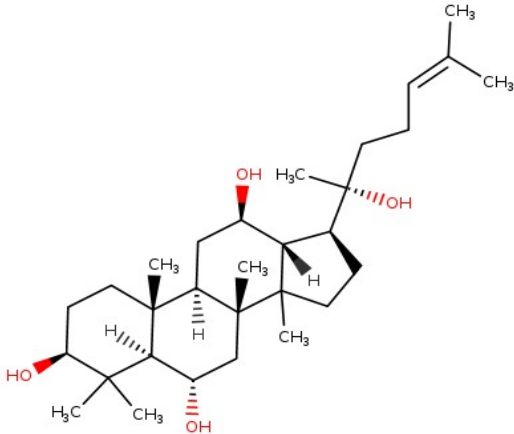
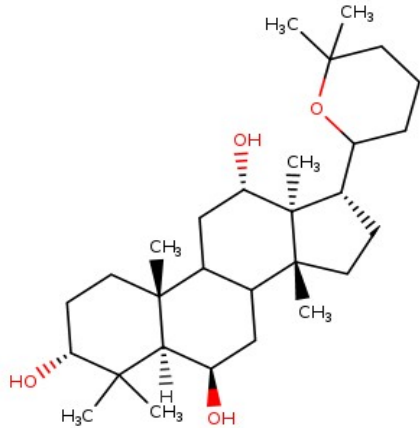
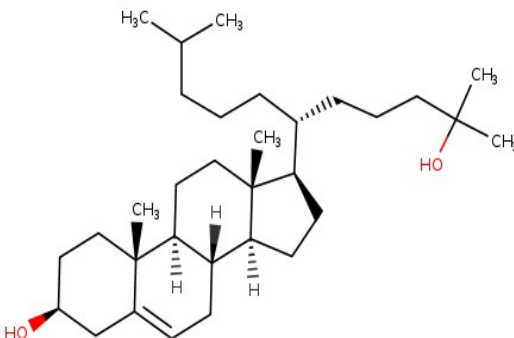
Tabelle 2: ROR γ t-inverse Agonisten.

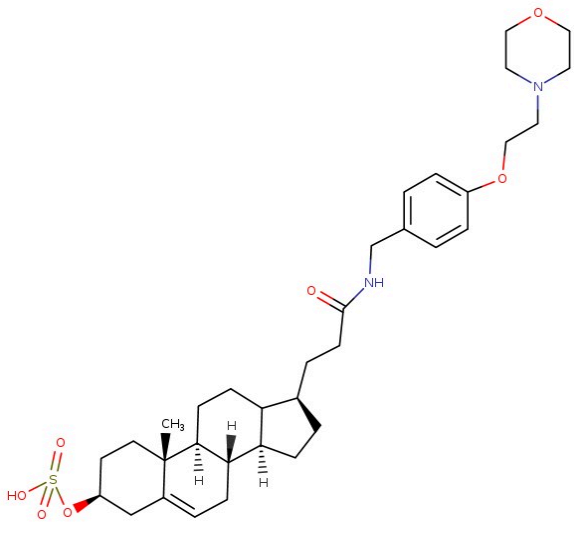
	Naturprodukt	Ziel(e)	Struktur

1	Ursolsäure	ROR _γ t-inverse Agonist [15].	
2	Methycorosolat	ROR _γ t-inverse Agonist [15].	
3	Uvaol	ROR _γ t-inverse Agonist [15].	

4	Oleonolsäure	ROR γ t-inverse Agonist [15].	
5	Rockogenin	ROR γ t-inverse Agonist [15].	
6	Amethinol A	ROR γ t-inverse Agonist [15].	

7	Digoxin	ROR γ t-inverse Agonist [15].	
8	Betulinsäure	ROR γ t-inverse Agonist [15].	
9	Phenanthrendiol	ROR γ t-inverse Agonist [22].	

10	Phenantrentriol	ROR γ t-inverse Agonist [22].	 Chemical structure of Phenantrentriol, a pentacyclic steroid. It features three hydroxyl groups (OH) at positions 3, 14, and 20, and a side chain at C-17 ending in an isopropenyl group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.
11	Panaxatriol	ROR γ t-inverse Agonist [22].	 Chemical structure of Panaxatriol, a pentacyclic steroid. It features three hydroxyl groups (OH) at positions 3, 14, and 20, and a side chain at C-17 containing a tetrahydropyran ring. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.
12	Phenanthrenol	ROR γ t-inverse Agonist [22].	 Chemical structure of Phenanthrenol, a pentacyclic steroid. It features two hydroxyl groups (OH) at positions 3 and 14, and a side chain at C-17 with a quaternary carbon atom. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.

13	Phenanthrenhydrosulfat	ROR γ t-inverse Agonist [22].	
----	------------------------	--------------------------------------	--

3.2.3 Analyse der chemischen Struktur der Naturstoffe

Die chemische Struktur der inversen Agonisten kann man in zwei Gruppen teilen: Steroide bzw. Cholesterol und Triterpenoide.

Zu den Triterpenoiden gehören Ursolsäure, Methycorosolat, Uvaol, Oleanolsäure und Betulinsäure. Diese Verbindungen bestehen aus fünf Cyclohexanringen, wobei Ursolsäure, Methycorosolat, Uvaol und Oleanolsäure fast identisch sind, mit kleinen Unterschieden am Ring A und E. Betulinsäure besitzt einen Cyclopentanring (Ring E) und eine Carbonsäuregruppe an Position 28. Rockogenin ist strukturell mit dem Agonisten Neurogenin verwandt, hat jedoch keine Hydroxylgruppe am C1, sondern am C12. Die anderen genannten Strukturen, nämlich Phenanthrendiol, Phenantrentriol, Panaxatriol, Phenanthrenol und Phenanthrenhydrosulfat, sind Steroide, die aus drei Cyclohexanen und einem Cyclopentanring bestehen. Sie weisen eine Hydroxylgruppe am C3 auf, ähnlich wie bei Cholesterin. Zusätzlich gibt es zwei Methylgruppen am C4 und eine Hydroxylgruppe am C12. Phenanthrenol und Phenanthrenhydrosulfat ähneln Cholesterin sehr, aber sie unterscheiden sich am C17, wo Phenanthrenol zwei seitenkettige C6-Seitenketten hat, während Phenanthrenhydrosulfat eine Morpholin-, Phenoxy- und Amidgruppe in Verbindung mit einer Schwefelsäure am C3-Hydroxyl aufweist.

Phenanthrendiol und Panaxatriol besitzen einen Tetrahydropyran am C17. Im Vergleich zu den anderen Steroidstrukturen hat Digoxin eine kurze Zuckerkette am C3, was seinen

hydrophilen Charakter erhöht. Außerdem hat es einen Furanon am C17 und gehört strukturell zu den herzwirksamen Glykosiden.

3.2.4 ROR γ -Antagonisten

Neben ROR γ -inverse Agonisten wurden auch ROR γ -Antagonisten entwickelt, die eine wichtige Rolle bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen spielen. Ein Antagonist ist eine Substanz, die einen Rezeptor blockiert, ohne seine Aktivität zu verändern, und dazu führt, dass der Rezeptor von Agonisten und inversen Agonisten nicht beeinflusst werden kann.

Ein Beispiel hierfür ist JTE-451, ein ROR γ -Antagonist, der von Japan Tobacco zur Therapie von Plaque-Psoriasis entwickelt wurde (Abbildung 6). Seine Wirkung wurde in einer 16-wöchigen Phase-2-klinischen Studie an 152 Patienten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die orale Verabreichung von 100 mg und 200 mg JTE-451 bei 33,3 % bzw. 42,0 % der Probanden den Psoriasis-Bereichs- und Schweregradindex (PASI) um 75 % reduzierte.

Im Februar 2021 wurde die Entwicklung von JTE-451 als orales Medikament abgeschlossen, da es seine Wirksamkeit in der klinischen Studie nachgewiesen hat. Derzeit befindet es sich jedoch in einer klinischen Phase-I-Studie zur topischen Anwendung [3] [12].

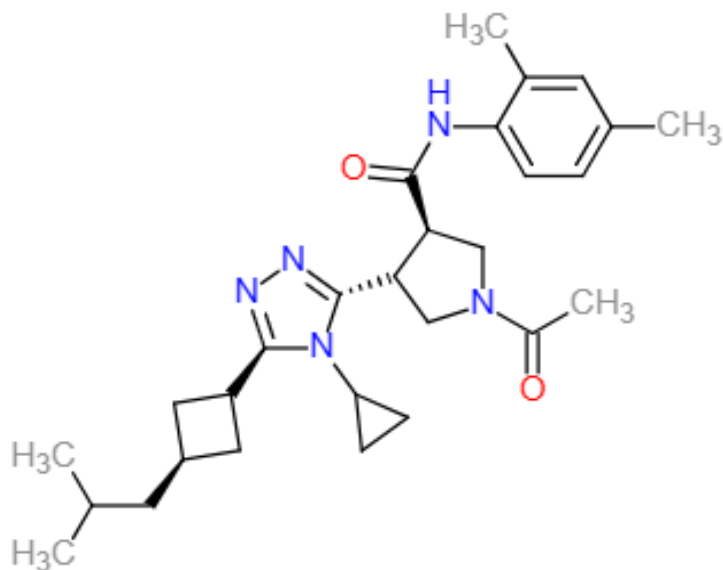


Abbildung 6: Struktur eines veröffentlichten ROR γ -Inhibitors von Japan Tobacco.

BI730357 ist auch ein entwickelter ROR γ -Antagonist, bei dem klinische Studien an Psoriasis-Patienten durchgeführt und abgeschlossen wurden [3].

Einige Antagonisten befinden sich in klinischen Studien, und es gab Fälle, in denen weitere Studien abgebrochen wurden, aufgrund von festgestellter schlechter Wirksamkeit oder mangelnder Sicherheit bei der Anwendung. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer sorgfältigen und gründlichen Bewertung potentieller Arzneimittelkandidaten, bevor sie zur breiten Anwendung freigegeben werden. Die Durchführung klinischer Studien ist ein wichtiger Schritt, um die Wirksamkeit und Sicherheit von Medikamenten zu bewerten, und der Abbruch solcher Studien kann notwendig sein, um die Gesundheit und das Wohlbefinden der Patienten zu gewährleisten.

4. Strukturanalyse von Steroiden und strukturell verwandeten Substanzen

Um ein besseres Verständnis dafür zu entwickeln, warum Substanzen als Agonisten, inverse Agonisten oder Antagonisten wirken und ihre molekularen Wirkmechanismen zu bewerten, werden Strukturanalysen *in vitro* durchgeführt. Dies erfolgt durch computergestützte Programme, die die Interaktionen zwischen Liganden und Zielproteinen darstellen können. Darüber hinaus können diese Programme auch Einsichten darüber liefern oder schätzen, wie stark oder schwach eine Verbindung *in vivo* wirkt.

Durch diese in vitro-Analysen können Forscher wichtige Erkenntnisse über die strukturellen Eigenschaften von Liganden und ihre Bindungsstellen an Zielproteinen gewinnen. Dies ermöglicht es ihnen, die Wirkungsweise der Substanzen auf molekularer Ebene zu verstehen und potenzielle Kandidaten für die weitere Entwicklung als Arzneimittel zu identifizieren.

4.1 Analysieren der PDB-Struktur

4.1.1 Agonisten

Die detaillierte Beschreibung der Strukturanalyse von Naturstoffen und naturstoffähnlichen Substanzen, insbesondere Steroiden, die eine Wirkung auf ROR γ haben, ist sehr informativ.

Die Analyse wurde unter Verwendung des Programms Maestro Schrödinger 13.7 durchgeführt, wobei insgesamt 216 PDB-Strukturen für Liganden mit Aktivität auf ROR γ untersucht bzw. gefunden wurden. Von diesen Strukturen wurden Zwei als Steroide identifiziert und in drei Gruppen eingeteilt:

1. Agonisten: 6 PDB-Strukturen (3KYT, 3LOJ, 3LOL, 4S14-Karton, 5NTI, 5NTN).
2. Inverse Agonisten: 11 PDB-Strukturen (3BOW, 6J3N, 5K3M, 6Q60, 7E3M, 7QP4-Karton, 7W3P, 7W3Q, 8GXP, 5NTK, 5X8Q).
3. PDB-Strukturen mit zwei Arten von gebundenen Liganden, einschließlich orthostatischer und allosterischer Liganden oder Agonisten und allosterischer inverser Agonisten (6Q60, 6T4G, 6T4J, 6T4K, 6T4T, 6T4U, 6T4W, 6T4X, 6T4Y, 6T50, 6TLQ, 6TLT).

Besondere Aufmerksamkeit wurde den ersten beiden Gruppen, den Agonisten und inversen Agonisten, geschenkt. Bei der Analyse und Betrachtung der Strukturen der ersten Gruppe wurde festgestellt, dass sie einen gemeinsamen Grundkörper besitzen, denn es sind Steroide-Derivate. Zum Beispiel unterscheiden sich 20-alpha-Hydroxycholesterin (5KYT), 25-alpha-Cholesterin (3LOL) und 22-alpha-Hydroxycholesterin nur durch das Einsetzen zusätzlicher OH-Gruppen in den Positionen 20, 25 bzw. 22. (Abbildung 8).

Alle Komplexe von ROR γ /20 α -HC, ROR γ /22R-HC und ROR γ /25-HC weisen eine sehr ähnliche LBD-Struktur auf, mit einer durchschnittlichen quadratischen Abweichung von etwa 0,5 Å für die C α -Atome. Sie nehmen alle eine gut definierte Position in der

Ligandenbindungstasche ein und sind vollständig in der unteren Hälfte des ROR γ -LBD eingeschlossen, wobei jede eine einzigartige Hydroxylgruppe aufweist, die sich an spezifischen Positionen der Cholesterin-Seitenkette befindet. Das Hydroxycholesterin orientiert sich mit seinem Hydroxylschwanz an der Helix H11 und der A-Ring an den Helices H1 und H2.

Alle ROR γ /20 α -HC-, ROR γ /22R-HC- und ROR γ /25-HC-Komplexe weisen eine äußerst ähnliche LBD-Struktur auf, mit einer durchschnittlichen quadratischen Abweichung von etwa 0,5 Å für die Ca-Atome. Sie nehmen alle eine identische, gut definierte Position in der Ligandenbindungstasche ein und sind vollständig in der unteren Hälfte des ROR γ -LBD eingeschlossen. Jeder Komplex trägt eine einzigartige Hydroxylgruppe an spezifischen Positionen der Cholesterin-Seitenkette. Das Hydroxycholesterin orientiert sich mit seinem Hydroxylschwanz an der Helix H11 und der A-Ring an den Helices H1 und H2 [14].

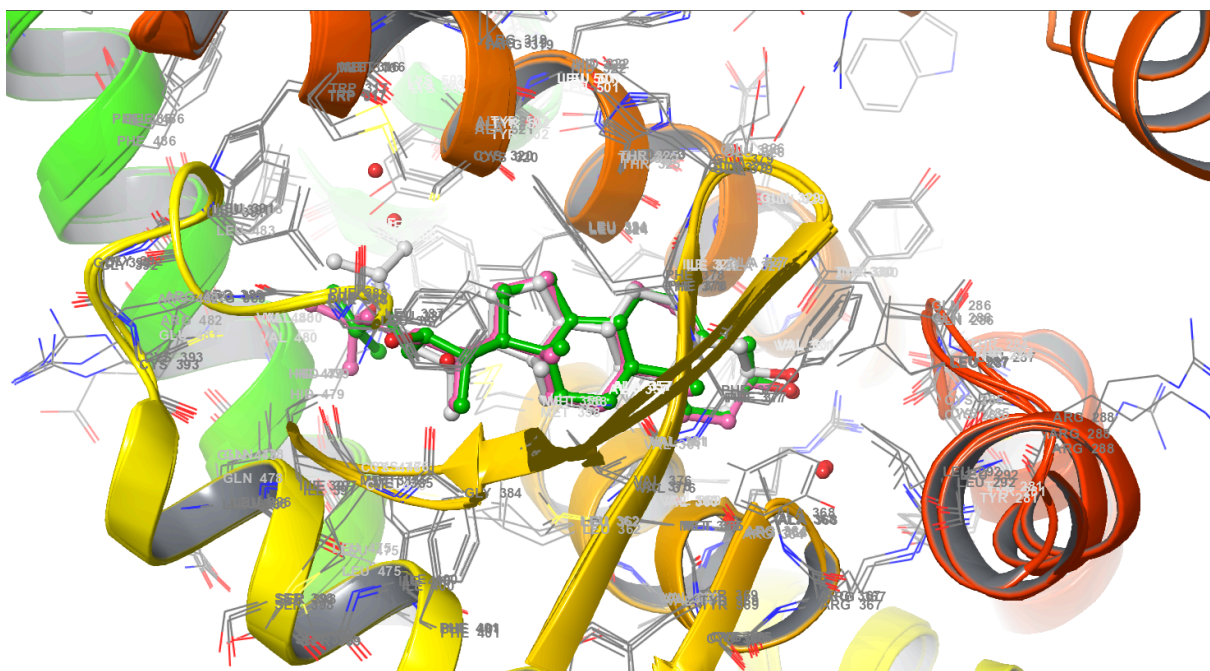


Abbildung 7: 20 α -HC-, ROR γ /22R-HC- und ROR γ /25-HC-Komplexe in der Bindetasche von ROR γ -LBD. 20- α -Hydroxycholesterol in Weiß (5KYT), 22 R-HC in Grün (3LOJ) und 25-HC in Rosa (3LOL).

25-Hydroxycholesterin stabilisiert indirekt Tyr 502 (auf H12) entweder über eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung oder direkt über die Hydroxygruppe an Position 25. Letztere bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Imidazolring von His 479 (auf

H11), wodurch H479 wiederum an stabilisierenden Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Tyr502 und Phe506 (beide auf Helix 12) beteiligt ist.

Die Hydroxygruppe an Position 3 (Ring A) kann eine Wasserstoffbrücke mit GLN 286 eingehen, und diese Gruppe ist für die Wirkung von Steroiden auf ROR-gamma essentiell (Abbildung 7).

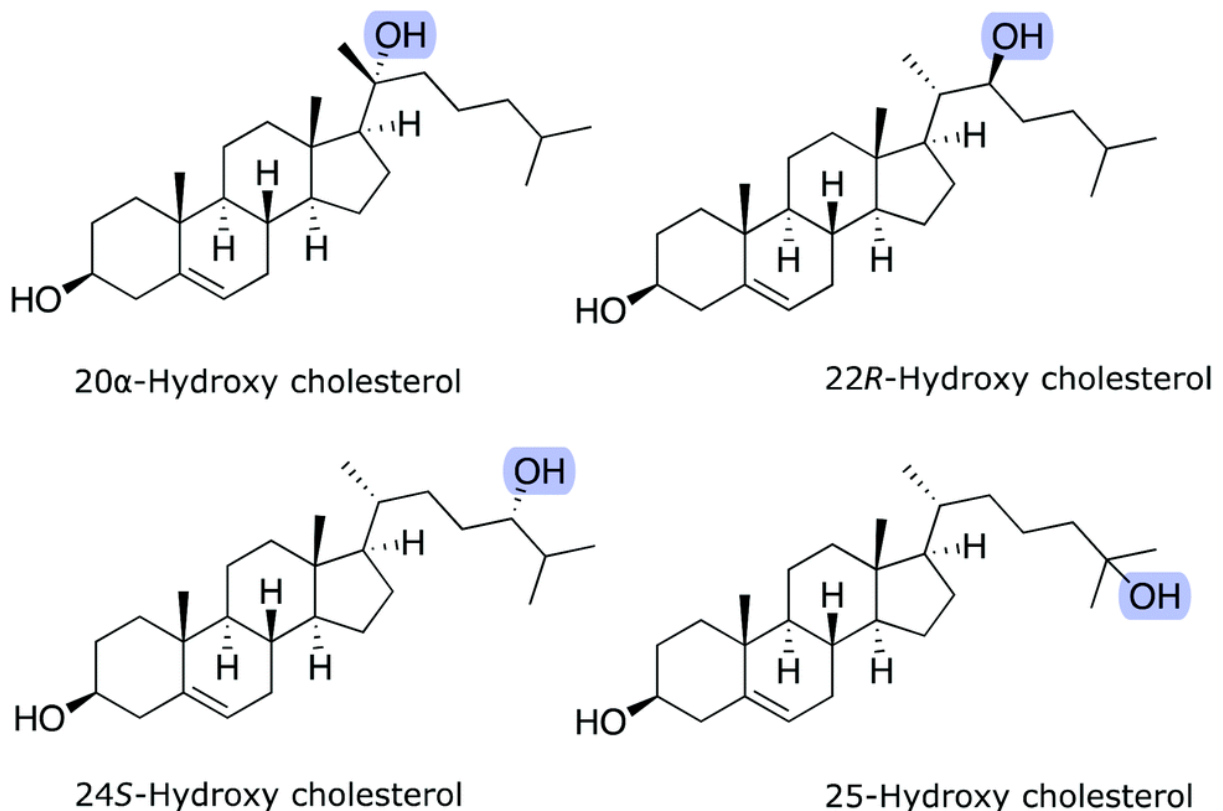


Abbildung 8: Steroide, die als Liganden von RORs fungieren können. Es wurde schon gezeigt, dass Hydroxycholesterin und seine Derivate an ROR γ binden und die Rekrutierung von Koaktivatorpeptiden verstärken. Quelle: [22]

4- α -carbonyl,4- β -methyl-Zymosterol, auch bekannt unter der Abkürzung 4ACD8 (PDB 4S14), besitzt an Position 4 eine α -ständige Carboxylgruppe und die Doppelbindung befindet sich zwischen C8 und C9 im Ring C. Die 4- α -carboxylgruppe bildet eine Salzbrücke mit dem ROR γ -LBD-Rest GLN286 und Leu287 [23].

Cyclopenta[*a*]phenanthren-3,7(4H)-dion ist ein weiterer Naturstoffagonist, dessen Koordinaten in der PDB 5NTN hinterlegt sind. An Position 3 wurde die Hydroxylgruppe durch eine Ketogruppe ersetzt, und zusätzlich verfügt die Struktur über eine zweite Ketogruppe an Position 7 im Ring B sowie eine OH-Gruppe am C26 in der Seitenkette.

Die terminale OH-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr502 und stabilisiert dadurch die Helix 12. Des Weiteren bildet sie eine Wasserstoffbrückenbindung mit His479. Die Carbonylgruppe am C3 bildet eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit Arg367 und Arg364. Der letzte Ligand ist Cholest-5-en-3-ylhydrogensulfat (PDB 5NTI), das eine Sulfatgruppe am C3 aufweist [24].

Beim Vergleich der Agonisten ist deutlich zu erkennen, dass sie sich alle nahezu in derselben Position in der Bindetasche befinden. Sie bewirken alle eine Stabilisierung der Helix 12 und verstärken dadurch die Wirkung des Rezeptors bei der Induktion von TH17-Bildung und IL-17-Freisetzung. Sowohl 25-Hydroxycholesterin als auch 4ACD8 fördern die Rekrutierung von Koaktivatorpeptiden. Darüber hinaus erhöhen sie die thermische Stabilität des ROR γ -LBD.

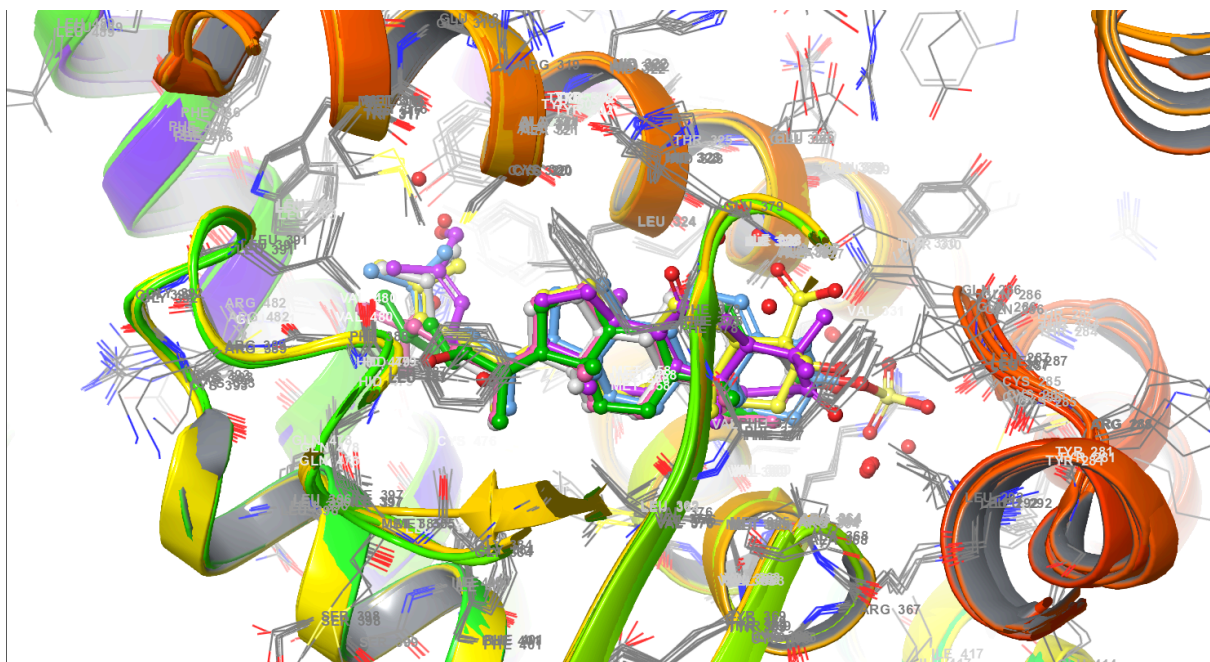


Abbildung 9: ROR γ t-Agonisten.

4.1.2 Inverse Agonisten

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Entdeckung von inversen Agonisten heutzutage von großer Bedeutung, da die Hemmung von ROR γ zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen beitragen kann. Die Koordinaten der Steroide und strukturverwandter Substanzen der inversen Agonisten sind in 11 PDB-Codes hinterlegt.

Digoxin (PDB: 3BOW) ist ein Suppressor der IL-17-Produktion und ein herzwirksames Glykosid. Es besteht aus drei Cyclohexanen und einem Cyclopentanring mit drei angehängten

OH-Gruppen an den Positionen C3, C12 und C14 sowie einer Zuckerkette (Trisaccharid). Um seine Aktivität auf ROR-gamma zu bestimmen, wurde die Kristallstruktur des ROR γ t LBD im Komplex mit Digoxin mit einer Auflösung von 2,2 Å analysiert [21].

Die Kristallstruktur hat gezeigt, dass Digoxin in der Ligandenbindungstasche des ROR γ t LBD gebunden ist. Dabei bildet es umfangreiche hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen mit dem Protein, darunter drei direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit Phe377, Arg367 und His479 sowie zwei wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindungen mit Glu379 und Val361. Diese Bindungen erfolgen zwischen den Sauerstoffatomen des Digoxins und den genannten Aminosäuren. Aufgrund dieser Interaktionen verhindert Digoxin die Positionierung der Helix H12 in der aktiven Konformation. Zusätzlich kann Digoxin in die Helix 11 eindringen und die agonistische Sperre vollständig aufheben.

Ursolsäure (5K3M, 5X8S), Betulinsäure (8GXP) und Ursonsäure (6J3N) sind alle pentazyklische Terpenoide, die zu den am häufigsten vorkommenden Ringsystemen in Naturprodukten gehören. Diese Liganden verfügen über eine Carboxylgruppe zwischen den Ringen D und E. Sie unterscheiden sich jedoch voneinander wie folgt: Betulinsäure hat anstelle des Cyclohexanrings am Ende der Struktur einen Cyclopentanring, und bei Ursonsäure wird die OH-Gruppe an Position 3 durch eine Ketogruppe bzw. Carbonylgruppe ersetzt.

Ursolsäure liegt linear in der Bindetasche vor, wobei ihre Carboxylgruppe in Richtung der Bindetaschenöffnung ausgerichtet ist. Sie bildet eine direkte Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoffatom des His323. Zusätzlich bildet die Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zu His479 (Helix 11), wodurch die Bewegung der Helix gehemmt wird und die Wasserstoffbrückenbindung zwischen His479 und Tyr502 unterbrochen wird [25].

Es wird beobachtet, dass sich eine Rückgrat-Position am Rest Phe486 in der Helix H11 in Richtung H12 bewegt und dann der stromabwärts gelegene Bereich von Phe486 abgewickelt wird [25].

Urschallsäure (6J3N) liegt nicht tief in der Bindetasche, und die OH-Gruppe der Carboxylgruppe bildet eine Salzbrücke mit dem Imidazolring von His323. Die Ketogruppe bzw. Carbonylgruppe der Carboxylgruppe bildet über ein Wassermolekül (HOH701) zwei

Wasserstoffbrückenbindungen, einmal mit dem Imidazolring und einmal mit der Ketogruppe von His323.

Das hydrophobe Skelett der Betulinsäure (8GXP) liegt tief in der hydrophoben Rille von ROR γ . Die Carboxylgruppe nähert sich His479, jedoch kommt es zu keiner direkten polaren Wechselwirkung mit ihm. Die Isopropylgruppe erstreckt sich in der hydrophoben Tasche, und die Hydroxylgruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe von Phe377, wodurch die Bindungskonformation von Betulinsäure stabilisiert wird.

Bei der Analyse der komplexen Strukturen von Ursolsäure und Betulinsäure wurde festgestellt, dass die Carboxylgruppe von Betulinsäure im Gegensatz zu Ursolsäure viel näher an H479 in der Tasche vergraben war. Dennoch wurde die Agonistensperre, bestehend aus His479, Tyr502 und Phe506 sowie einem Wassermolekül, nicht gebrochen.

Rockogenin (5X8Q) ist ein natürlicher Ligand, der eine schwache inhibitorische Aktivität auf ROR γ mit EC₅₀ im Wert von 5,1 μ m im Transkriptionsassay zeigte [25].

Die linear geformte Verbindung passt sich gut in der Bindungstasche an und positioniert den Tetrahydropyran-Ring in Richtung des hydrophoben Bereichs. Die OH-Gruppen an Position 3 und 12 bilden jeweils zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffatomen von Cys285 und Phe377. Der Tetrahydropyranring interagiert hydrophob mit den Aminosäuren Cys320, Leu324, Leu396, Ile397 und Ile400 [25]. Die hemmende Wirkung von Rockogenin ergibt sich durch die Überlagerung seiner Inhibitorkonformation mit der aktiven Konformation des Zielproteins.

Ein weiterer interessanter Ligand ist Phenanthrenol, ein Cholesterinderivat, das eine zweiarmlige lange Seitenkette am Ring D trägt. Dies ist der einzige strukturelle Unterschied zu Cholesterol. Um die Bindungsmodi von Phenanthrenol zu charakterisieren, wurde die Röntgenkristallographie verwendet. Die entsprechenden Daten sind in der Protein-Datenbank (PDB) unter der Kennung 7QP4 hinterlegt.

Obwohl Phenanthrenol ein großer und langer Ligand ist, passt es sehr gut in die Bindungstasche des Zielproteins. Die hydroxylierte Seitenkette zeigt in Richtung Helix 11 und nimmt den entsprechenden Taschenbereich ein, während die zweite Seitenkette in Richtung Helix 5 zeigt und eine zusätzliche Tasche besetzt, die durch eine Verschiebung der Hauptkettenatome von Helix 5 und der N-terminalen Helix 11 sowie durch eine

konformationelle Umorientierung der Seitenketten von Cys476, Met358 und Leu362 entstanden ist.

Die möglichen Interaktionen mit dem ROR γ -LBD werden durch Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt. Die 3-OH-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Gln286 und eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit Arg367, während die 25-OH-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Imidazolring von His479 bildet.

Die Position der hydroxylierten Seitenkette führt zu einer Umorientierung von Trp317 und einer Verdrängung von His479. Dies führt dazu, dass die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen His479 und Tyr502 gehemmt wird. Die neue Konformation verhindert die Annahme der Agonistenkonformation durch Helix 11 und Helix 12 und die Rekrutierung von Koaktivatoren. Dies deutet darauf hin, dass Phenanthrenol als inverser Agonist auf ROR γ wirkt. Seine Wirkung wird möglicherweise durch einen "Push-Pull"-Mechanismus mit einem Flip von Trp317 und einer Neuorientierung von His479 oder durch allosterische Effekte vermittelt [22].

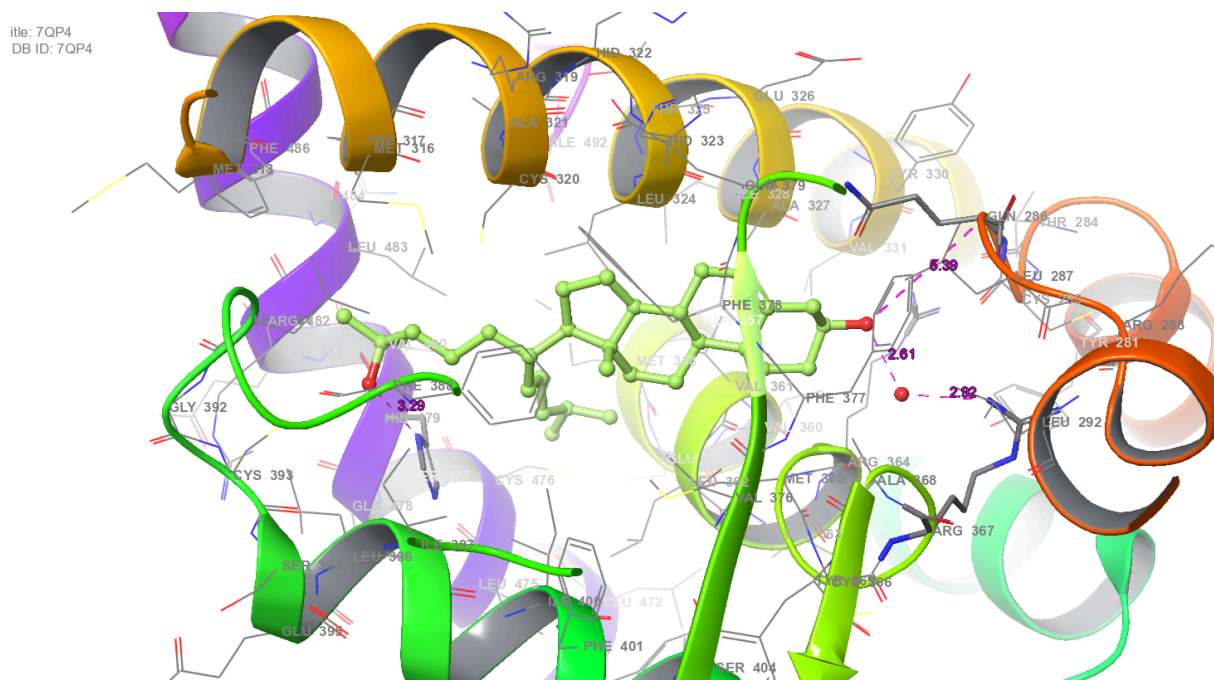


Abbildung 10: Phenanthrenol, PDB:7QP4. Die möglichen Interaktionen zwischen Phenanthrenol und ROR γ -LBD.

Ausgehend von Cholesterinsulfat erhält man durch Verlängerung der Seitenkette einen inversen Agonisten namens Phenanthrenhydrosulfat. Dieses Molekül besitzt anstelle einer 3-OH-Gruppe ein Hydrosulfat und eine sehr lange Seitenkette, die einen Morpholinring, eine Amidgruppe und Phenoxygruppen enthält.

Aufgrund der Größe dieser Struktur bleibt ein Teil des Morpholinrings außerhalb der Bindetasche. Diese Erweiterung am Cholesterinsulfat-Grundgerüst führt zu einem sterischen Konflikt, insbesondere mit Trp317 in der Agonistenbindungstasche. Der Grund dafür ist, dass die Morpholinoethoxybenzylgruppe mit Trp317 inkompatibel ist und einen Umschlag von Trp317 in eine Position induziert, die mit Tyr502 konkurriert, wenn eine Wasserstoffbrückenbindung mit His479 eingegangen wird.

Die Carbonylgruppe des Amids bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem NH von Ser477 und eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit dem CO von Leu475 [24].

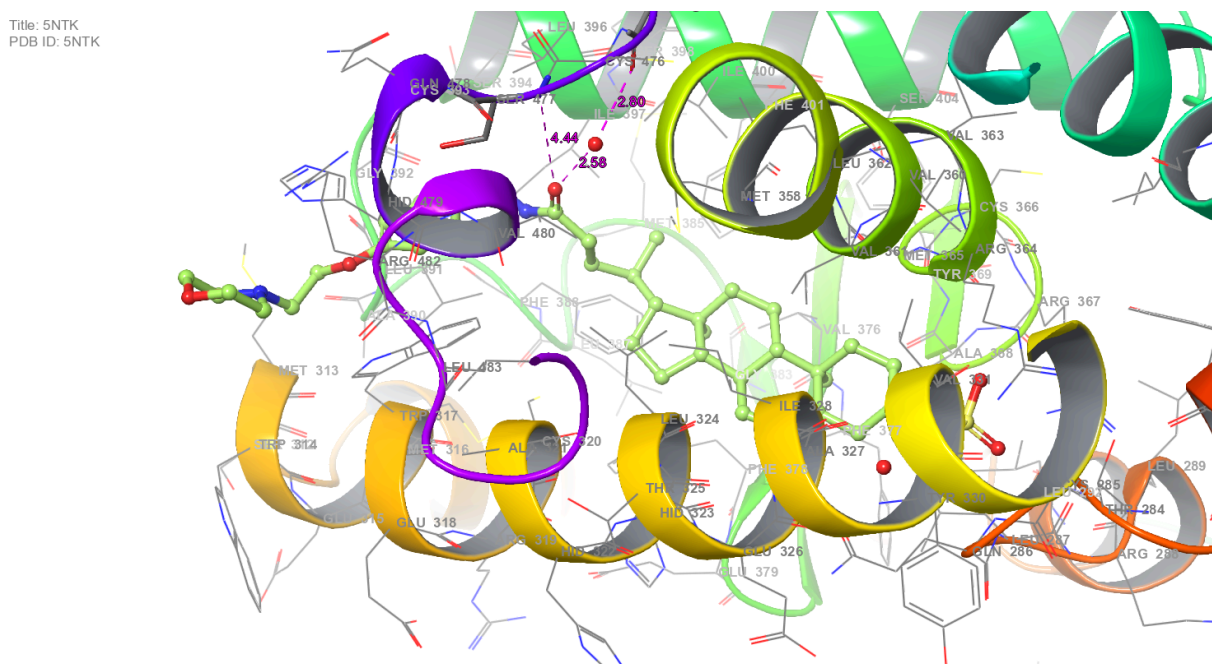


Abbildung 11: Phenanthrenhydrosulfat, PDB:5NTK und seiner Interaktionen und Lage in der Bindetasche.

Phenanthrendiol (PDB 7W3P) und Panaxatriol (PDB 7E3M) besitzen den Grundkörper von Cholesterin mit einem zusätzlichen Tetrahydropyranring am C17 und

keine lange Seitenkette. Beide Strukturen verfügen über zwei Hydroxylgruppen am C3 und C12, wobei Panaxatriol, wie der Name sagt, eine zusätzliche OH-Gruppe am C6 (Ring B) hat.

Beide Liganden passen gut in die Bindetasche. Die 3-OH-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Phe377, während die 12-OH-Gruppe mit Cys320 interagiert. Phenanthrentriol (PDB 7W3Q) befindet sich tief in der Bindetasche, wobei sich der Grundkörper des Moleküls in Richtung der Öffnung ausrichtet.

Die inversen Agonisten, die eine ähnliche Bindungspose in der Bindetasche aufweisen, wurden in drei Gruppen zusammengefasst.

1. Die erste Gruppe umfasst Ursolsäure und Urschallsäure, deren Koordinaten in den PDB-Einträgen 5K3M und 6J3N abgelegt sind. Bei der Betrachtung der Kristallstrukturen wurde festgestellt, dass beide inversen Agonisten fast identische chemische Strukturen aufweisen, mit nur einem einzigen Unterschied: Urschallsäure besitzt am C3 eine Carbonylgruppe anstelle der Hydroxygruppe. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit ist auch ihre Positionierung in der Bindetasche gleich.
2. Die zweite Gruppe besteht aus Betulinsäure (PDB 8GXP) und Phenanthrendiol (PDB 7W3P). Beide Liganden zeigen eine sehr ähnliche Bindungsposition in der Bindetasche, wobei sie tief darin liegen und der Ring A sich zur Öffnung hin ausrichtet. Zudem sind ihre Grundkörper gut aufeinander abgestimmt.
3. Die dritte Gruppe umfasst die Strukturen Phenanthrenol (PDB 7QP4) und Phenanthrenhydrosulfat (PDB 5NTK). Die Grundkörper der Liganden sind identisch, wobei der Hauptunterschied in den Seitenketten liegt. Diese Seitenketten sind in Richtung der Öffnung ausgerichtet.

Die Seitenkette von Phenanthrenhydrosulfat ist sehr lang, sodass der Morpholinring außerhalb der Bindetasche liegt, während Phenanthrenol vollständig in der Tasche liegt.



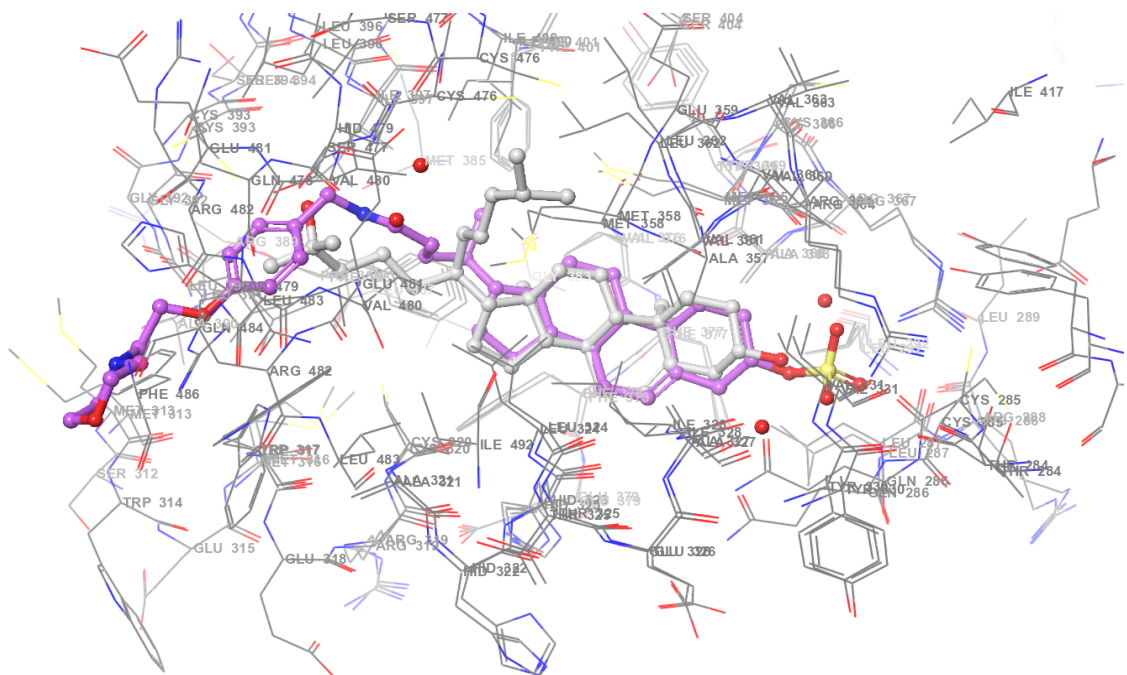


Abbildung 14: Phenanthrenol (7QP4) in weiß und Phenantrenhydrosulfat (5NTK) in Lila in der Bindetasche, bei Phenantrenhydrosulfat sieht man deutlich die lange Seitenkette, die weiter außen liegt.

Mögliche Interaktionen zwischen inverse Agonisten und ROR γ -LBD zusammengefasst in der untenstehenden Tabelle.

Tabelle 3: Naturestoffe, die eine hemmende Wirkung auf ROR-Gamma haben und deren Interaktionen mit ihm.

Strukturen-PDB	Auflösung	Interaktionen zwischen den Liganden und ROR γ -LBD
Digoxin (3BOW)	2,20	Wasserstoffbrückenbindungen mit Phe377, Arg367 und His479. Wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit Glu379 und Val361

Ursolsäure (5K3M, 5X8S)	2,89, 2,20	Wasserstoffbrückenbindung mit His323 (Carbonylgruppe der Ursolsäure) und mit His479 (Hydroxylgruppe der Ursolsäure)
Urschallsäure (6J3N)	1,99	Salzbrücke mit Imidazolring von His323 (OH-Gruppe der Carboxylgruppe) Wassermolekülvermittelte (HOH701) Wasserstoffbrückenbindungen mit Imidazolring und Ketogruppe von His323 (Carbonylgruppe der Carboxylgruppe)
Betulinsäure (8GXP)	2,45	Wasserstoffbrückenbindung mit Phe377 (Hydroxylgruppe am C3) Die Carboxylgruppe nähert sich an His479 ohne Interaktionen mit ihm
Rockogenein (5X8Q)	2,20	Wasserstoffbrückenbindung durch C3 und C12-OH-Gruppe mit Sauerstoffatome von Cys285 und Phe377. der Tetrahydropyranring macht hydrophoben Wechselwirkungen mit folgenden Aminosäuren Cys320, Leu324, Leu396, Ile397 und Ile400.
Phenanthrenol (7QP4)	2,30	Wasserstoffbrückenbindungen Gln286 (3-OH-Gruppe) und mit His479 (25-OH-Gruppe) Wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit Arg367

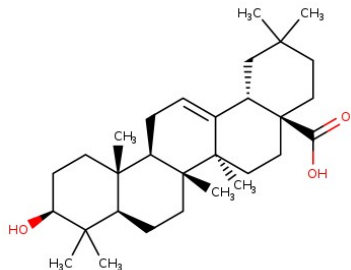
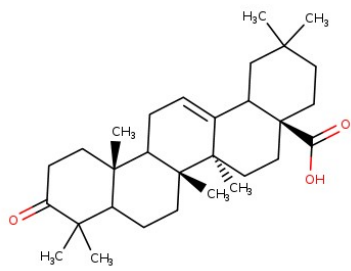
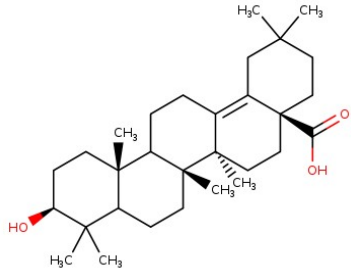
Phenanthrenhydrosulfat (5NTK)	1,90	Die Carbonylgruppe von Amid bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit NH-Ser477 und wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit CO-Leu475.
Phenanthrendiol (7W3P), Panaxatriol (7E3M)	1,77 2,80	Die 3-OH-Gruppe bildet Wasserstoffbrückenbindung mit Phe377 und die 12-OH-Gruppe mit Cys320.

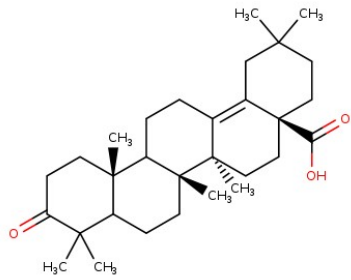
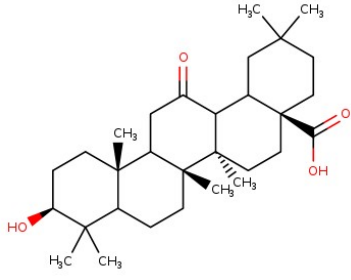
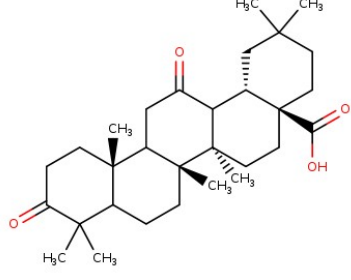
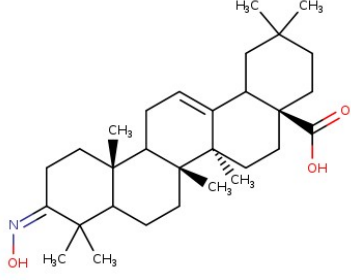
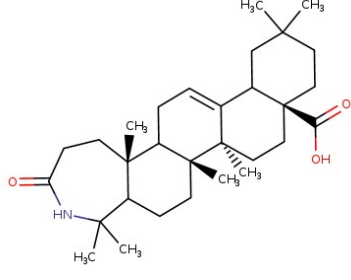
Nach der Analyse der PDB-Koordinaten wurde festgestellt, dass die Bindetasche sehr flexibel ist und sich ausdehnen kann, um perfekt zu einem Liganden zu passen. Interessanterweise wurde festgestellt, dass sich die Positionierung einiger inverser Agonisten in der Bindetasche unterscheidet. Während sich Betulinsäure tief in der Bindetasche befindet (PDB 8GXP), zeigt Urschallsäure (PDB 6J3N) eine weniger tiefe Positionierung und befindet sich gewissermaßen vorne in der Bindetasche. Zwei Wassermoleküle, die eine Rolle bei der Interaktion der Liganden mit dem Protein spielen, wurden in den Bindetaschen von 8GXP und 6J3N entdeckt, nämlich HOH715 bei 8GXP und HOH701 bei 6J3N.

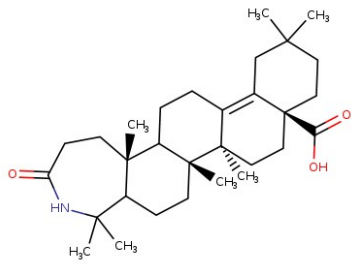
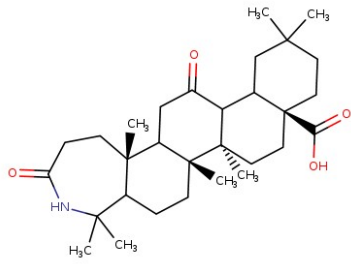
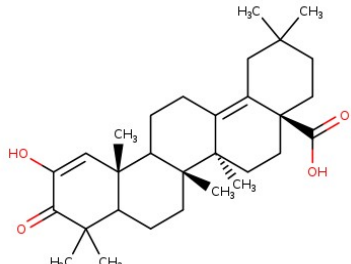
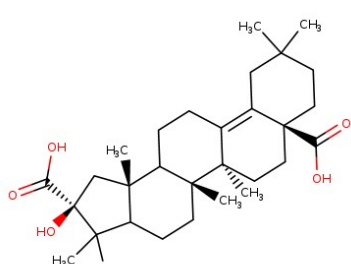
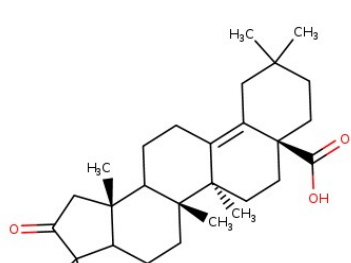
Die wichtigsten Strukturmerkmale von Oleanolsäure bzw. Oleanolic acid sind eine Hydroxylgruppe am C3, Dimethylgruppen am C4 und C20 sowie eine Carboxylgruppe am C17. Basierend auf diesen Merkmalen wurden 15 Oleanolsäure-Analoga mit geringfügigen strukturellen Änderungen entworfen. Die 15 Derivate sind alle in Tabelle 3 dargestellt.

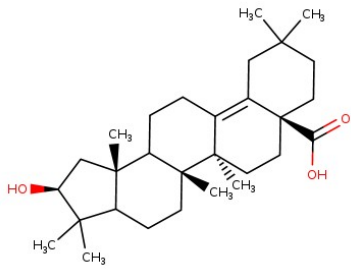
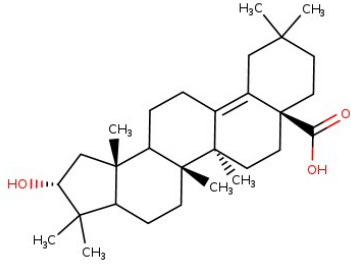
In der untenstehenden Tabelle sind die Strukturen aufgelistet:

Tabelle 4: Oleanolsäure-Derivate bzw. Oleanolic acid-Derivate, die möglicherweise einen hemmenden Effekt auf ROR-Gamma ausüben:

	ID	Struktur	Dockingscore
1	Oleanolic acid-1		6J3N:-10,187 kcal/mol
2	Oleanolic acid-2		6J3N:-10,336 kcal/mol
3	Oleanolic acid-3		6J3N:-9,289 kcal/mol

4	Oleonolic acid -4		6J3N:-10,025 kcal/mol
5	Oleonolic acid-5		6J3N:-10,735 kcal/mol
6	Oleonolic acid -6		6J3N:-10,735 kcal/mol
7	Oleonolic acid-7		6J3N:-10,133 kcal/mol
8	Oleonolic acid-8		6J3N:-9,850 kcal/mol

9	Oleonolic acid-9		6J3N:-9,159 kcal/mol
10	Oleonolic acid-10		6J3N:-10,589 kcal/mol
11	Oleonolic acid-11		6J3N:-9,662 kcal/mol
12	Oleonolic acid-12		6J3N:-9,465 kcal/mol
13	Oleonolic acid-13		

14	Oleonolic acid-14		6J3N:-9,193 kcal/mol
15	Oleonolic acid -15		6J3N:-9,885kcal/mol

Docking-Ergebnisse:

Oleonolic-Strukturen in 6J3N:

Unsere Docking-Experimente mit Glide (mittels Maestro Schrödinger 13.7) unter Verwendung einer Röntgenkristallstruktur des menschlichen ROR γ -LBD im Komplex mit Ursensäure (PDB-Struktur 6J3N) deuten darauf hin, dass Oleanolsäure bzw. Oleonolic acid und ihre Derivate (Oleonolic acid derivs. 1 bis 15) wahrscheinlich den gleichen Bindungsmodus aufweisen wie Ursensäure und sehr gut in der ko-kristallisierten Struktur positioniert sind. Die für die Verbindungen berechneten Docking-Scores lagen zwischen -9,159 kcal/mol (für Oleonolic-9) und -10,735 kcal/mol (für Oleonolic acid-5 und Oleonolic acid-6), was auf günstige Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen und den Resten des Proteins hinweist.

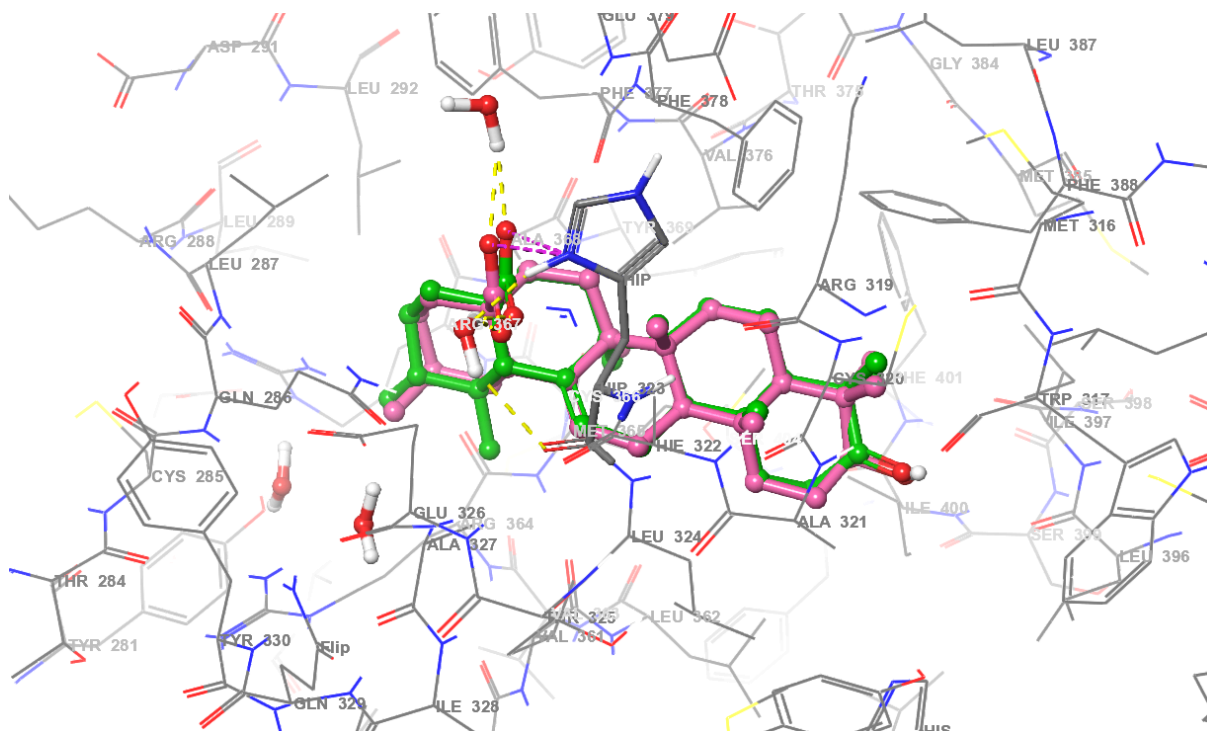


Abbildung 16: Die möglichen Interaktionen von Oleonic acid mit 6J3N, anhand von Oleonic acid 1. Oleonic acid 1(rosa), Ursonsäure(grün).

Basierend auf den vorhergesagten Bindeposen wird erwartet, dass die Verbindungen (Oleonic acid 1 und ihre Derivate) durch die vorhandene Carboxylgruppe über ein Wassermolekül (HOH701) zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit His323 bildet: einmal mit dem Imidazolring und einmal mit der Keto- bzw. Carbonylgruppe. Darüber hinaus ist es auch möglich, eine Salzbrücke zwischen der Carboxylgruppe der Liganden und dem Imidazolring von His323 zu bilden. Ein zweites Wassermolekül (HOH743) ist ebenfalls in der Bindetasche vorhanden, mit dem die Carboxylgruppe ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen kann (Abbildung 16).

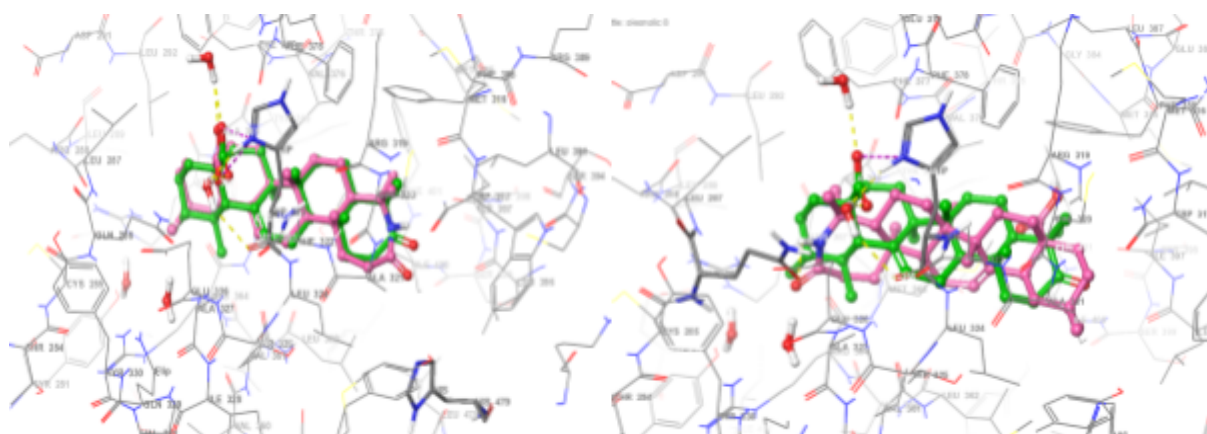


Abbildung 17: Die zwei unterschiedlichen Positionen von Leonolic acid-8 in 6J3N. Leonolic 8 (rosa), Ursonsäure (grün).

Bei Leonolic acid-8, -9 und -10 wurde beobachtet, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom des Azepanrings und Glu286 besteht. Darüber hinaus können diese Liganden in zwei verschiedenen Positionen in der Bindetasche vorliegen. In einer Position ist der Azepanring in der Nähe von His479 positioniert, was es ermöglicht, direkt oder indirekt mit ihm zu interagieren und die agonistische Sperre aufzubrechen. In der anderen Position liegt der Azepanring in der Nähe von Glu286. Also, die Addition von Stickstoffatom kann nützlich sein (Die Interaktionen sind in Abb.17 anhand von Leonolic acid 8 dargestellt).

Laut dem Docking-score sind die Liganden aktiv und können eine Wirkung auf unser Zielprotein ausüben. Jedoch kann die Realität natürlich anders aussehen. Um festzustellen, welche Struktur in vitro tatsächlich aktiv ist, wurden einige Leonolic-Analoga in vitro getestet. Dabei wurden folgende Derivate als aktiv identifiziert: Leonolic acid-1 und Leonolic acid-7. Hingegen waren Leonolic acid-2, -3 und -8 inaktiv, was nicht mit den Dockingergebnissen übereinstimmt.

Da Leonolic acid-1 und Leonolic acid-7 tatsächlich eine aktive Wirkung zeigen, könnten sie in Zukunft als Vorlage für die Synthese neuer inverser Agonisten dienen. Die Carboxylgruppe erweist sich als äußerst wichtig und essentiell für die Aktivität. Daher sollte diese funktionelle Gruppe bei der Strukturoptimierung beibehalten werden. Eine mögliche Ergänzung der Struktur könnte das Einfügen einer funktionellen Gruppe mit Wasserstoffbrückendonator am Ring D sein, der sich in der Nähe der Agonistensperre befindet. Durch die Bildung von Interaktionen könnte diese Gruppe die Sperre in eine schwächere Lage bringen und somit aufbrechen. Für Leonolic acid 13 wurden keine Bindungsergebnisse ergeben.

4.3 IMNA (24Z-Isomasticadienocid) und seine Derivate

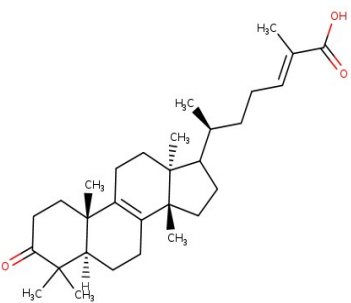
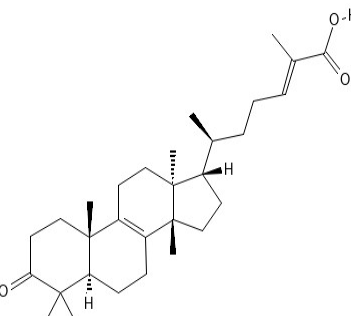
24Z-Isomasticadienocid-Säure, abgekürzt als IMNA, und ihre Derivate bilden eine neue Serie von Verbindungen, die möglicherweise einen antagonistischen Effekt auf ROR haben. IMNA ist Harz von Pistacia lentiscus var. chia. Im Grunde handelt es sich bei ihnen um Steroide mit einer Carbonsäuregruppe am Ende der langen Seitenkette am Ring D. Sie unterscheiden sich von Cholesterol dadurch, dass sie die OH-Gruppe am C3 des Ring A durch eine Carbonylgruppe ersetzen (IMNA 1 bis IMNA 8). Bei IMNA 9, 10, 11, 12, 13 und 14 wird ein

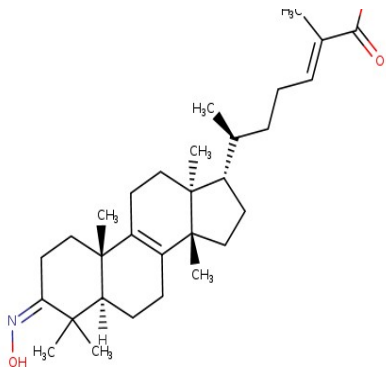
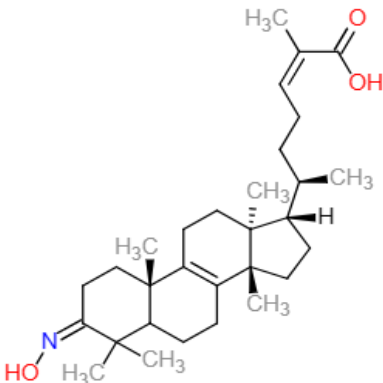
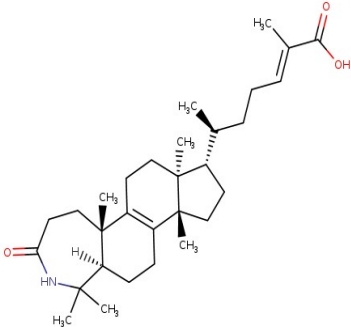
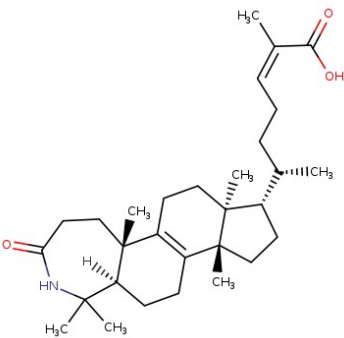
Cyclopentanring anstelle eines Cyclohexans im Ring A verwendet, wobei die OH-Gruppe durch eine Ketogruppe ersetzt wird. Interessanterweise findet sich bei IMNA 9 und IMNA 10 eine zweite Carboxylgruppe am Ring A, was die Struktur noch saurer macht. (Die Derivate sind in Tabelle 5 zusammengefasst und abgebildet).

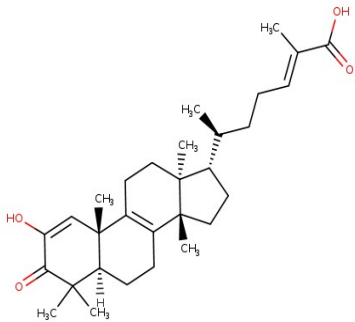
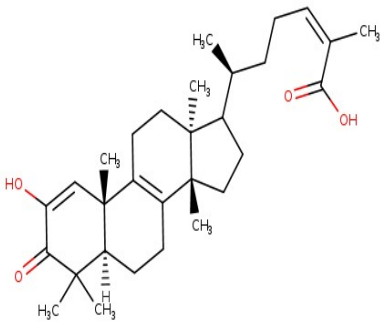
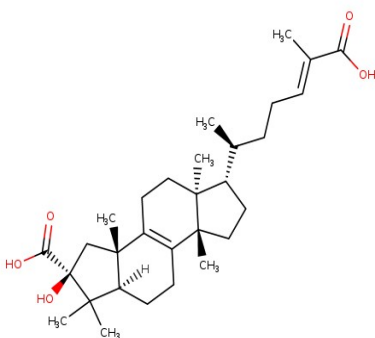
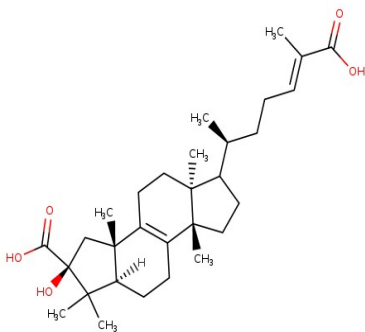
Wie bereits bekannt ist, zeigen Substanzen mit steroidartigen Grundstrukturen eine Wirkung auf ROR. Daher wurde vermutet, dass auch IMNA-Derivate als inverse Agonisten fungieren können. Zu diesem Zweck wird ihre Fähigkeit, die Wirkung von ROR zu inhibieren, in vitro mittels Docking-Verfahren (Maestro Schrödinger 13.7) untersucht. Die Aktivität von IMNA1 wurde in vitro untersucht und erwies sich als aktiv. Für die anderen Strukturen wurde bisher noch keine experimentelle Untersuchung durchgeführt, jedoch wurden bereits in vitro-Studien (mittels Maestro Schrödinger) durchgeführt.

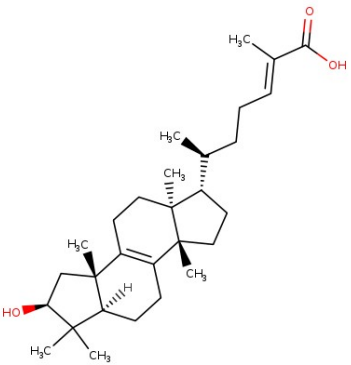
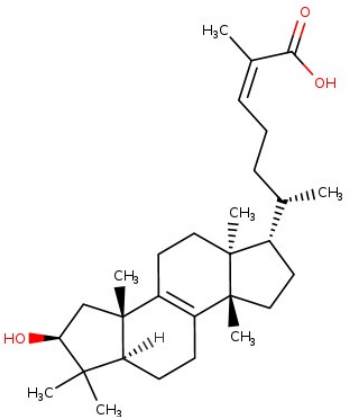
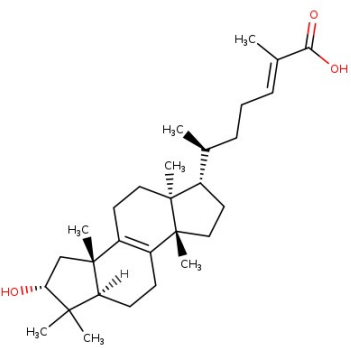
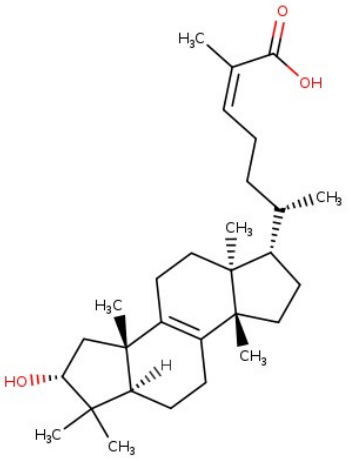
In der untenstehenden Tabelle sind die Strukturen aufgelistet:

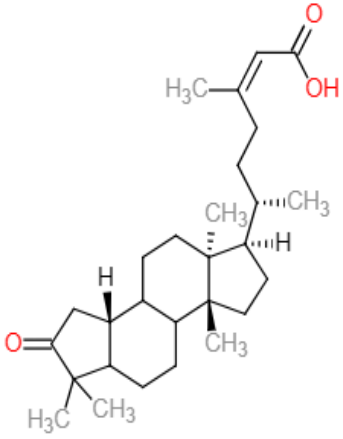
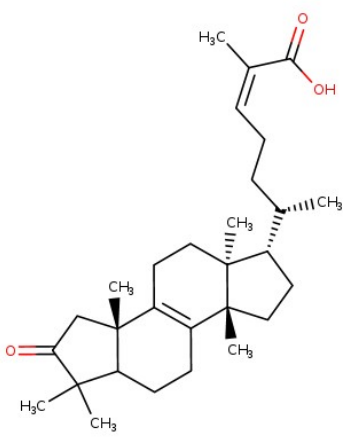
Tabelle 5: IMNA-Strukturen, die möglicherweise einen hemmenden Effekt auf ROR-Gamma ausüben:

	ID	Struktur	Docking-Score
1	IMNA 1		6J3N:-10,375 kcal/mol
2	IMNA 2		6J3N:-9,512 kcal/mol

3	IMNA 3		6J3N:-10,236 kcal/mol
4	IMNA 4		6J3N:-8,381 kcal/mol
5	IMNA 5		6J3N:-9,670 kcal/mol
6	IMNA 6		6J3N:-9,064 kcal/mol

7	IMNA 7		6J3N:-10,440 kcal/mol
8	IMNA 8		6J3N:-9,844 kcal/mol
9	IMNA 9		6J3N:-10,271 kcal/mol
10	IMNA 10		6J3N:-9,529 kcal/mol

11	IMNA 11		6J3N:-10,161 kcal/mol
12	IMNA 12		6J3N:-9,697 kcal/mol
13	IMNA 13		6J3N:-10,029 kcal/mol
14	IMNA 14		6J3N:-9,231 kcal/mol

15	IMNA 15		
16	IMNA 16		6J3N:-9,315 kcal/mol

Docking-Ergebnisse:

IMNA-Derivate in 6J3N:

Unsere Docking-Experimente mit Glide unter Verwendung einer Röntgenkristallstruktur des menschlichen ROR γ -LBD im Komplex mit Ursensäure (PDB-Struktur 6J3N) deuten darauf hin, dass IMNA und ihre Derivate (IMNA 1 bis 16) wahrscheinlich den gleichen Bindungsmodus aufweisen wie Ursensäure und teilweise gut in der ko-kristallisierten Struktur positioniert sind. Die für die Verbindungen berechneten Docking-Scores lagen zwischen -8,383 kcal/mol (für IMNA 4) und -10,440 kcal/mol (für IMNA 7), was auf günstige Wechselwirkungen zwischen den Verbindungen und den Resten des Proteins hinweist.

Die Anwesenheit einer Carboxylgruppe in der Seitenkette ermöglicht es den Liganden, über ein Wassermolekül (HOH701) mit His323 zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden.

Darüber hinaus bildet die Hydroxylgruppe der Carboxylgruppe eine Salzbrücke mit dem Imidazolring von His323 und eine Wasserstoffbrückenbindung mit HOH743.

Interessante zwei Bindungsmodi wurden bei IMNA-Analoga (IMNA 1 bis 10) und drei bei IMNA 11, 12, 13, 14 und IMNA 16 beobachtet. Für IMNA 15 gab es keine Docking-Ergebnisse (Darstellung der unterschiedlichen Bindungsmodi anhand von IMNA 11 in Abb.18).

In einer Bindungsposition befindet sich der Ligand in derselben Position und Ausrichtung wie der ko-kristallisierte Ligand von 6J3N. Bei einer anderen Position ist die Struktur umgedreht, und die Seitenkette ist in Richtung der agonistischen Sperre ausgerichtet. Hier ist die Struktur in der Lage, eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr502 (Teil der agonistischen Sperre) zu bilden, was direkt zum Aufbrechen der Sperre führt. Dies kann die Wirkung von ROR direkt hemmen. Bei IMNA 11 bis IMNA 16 verschiebt sich der Ligand in die tiefere Position der Bindetasche und nähert sich der agonistischen Sperre (Ring A zeigt in Richtung der agonistischen Sperre), was möglicherweise zu einem direkten oder indirekten Aufbrechen der Sperre führen kann.

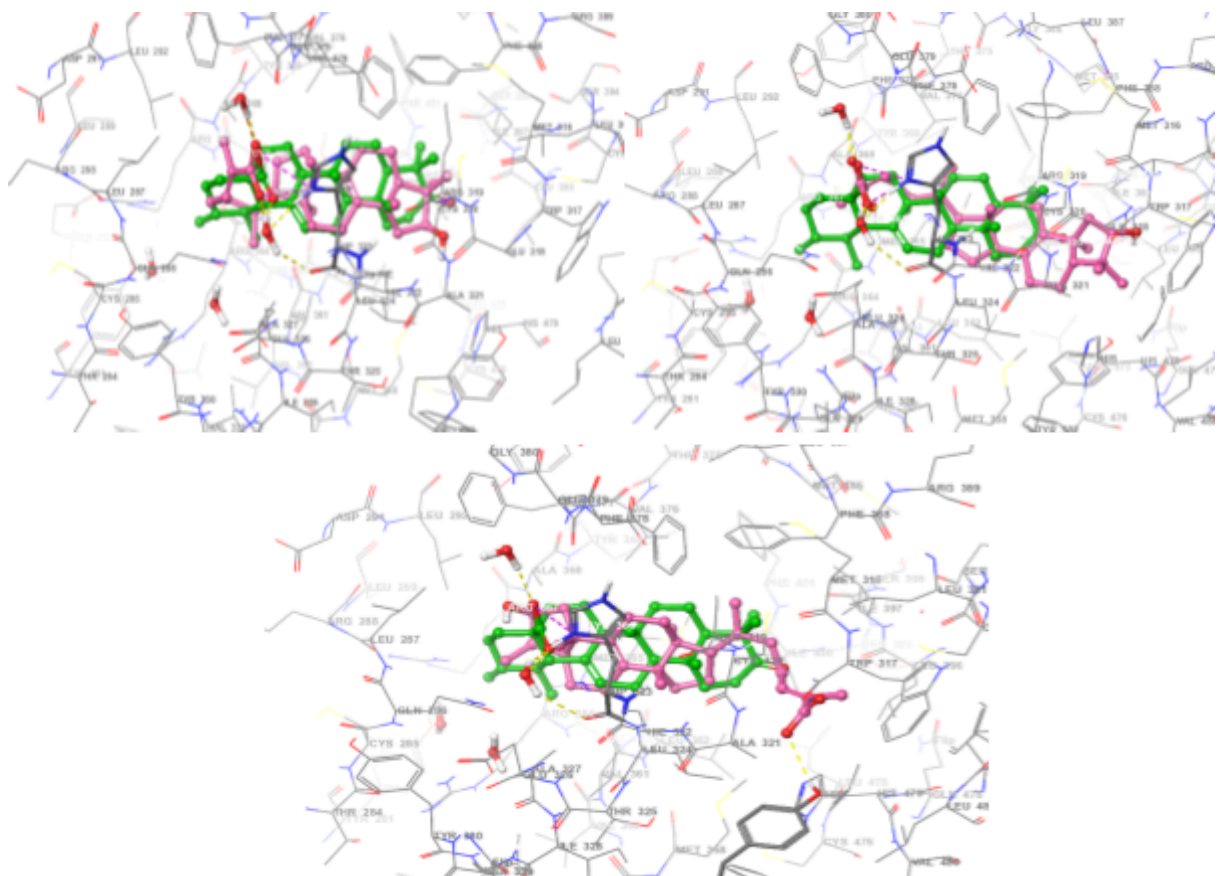


Abbildung 18: Die drei Bindungsmodi bzw. Bindungspositionen von IMNA 11 in 6J3N. Ursolsäure (grün), IMNA 11(rosa).

Die lange Seitenkette am Ring D erweist sich als nützlich, um die Agonistensperre durchzubrechen. Allerdings liegt das Problem darin, dass diese lange Kette in der optimalen Orientierung des Ligandes nicht in Richtung der Sperre ausgerichtet ist. Zudem ist sie nicht bei allen Derivaten in der Position, in der der Ligand tief in der Bindetasche liegt und die Kette in die gewünschte Richtung ausgerichtet ist. In solchen Fällen liegt der inverse Agonist nicht gut auf der co-kristallisierten Ursolsäure auf. Die Dockingscores sind bereits hoch, aber die tatsächliche Wirkung in der Realität kann nicht garantiert werden. Daher spielen Experimente in diesem Fall eine entscheidende Rolle für die Entscheidung, ob diese Serie von Strukturen beibehalten und weiter optimiert oder einfach fallen gelassen werden soll. Da nur IMNA 1 getestet wurde und sich als aktiv erwiesen hat, und sein Dockingscore relativ hoch ist, ist es wahrscheinlich, dass auch einige der Derivate aktiv sind. Außerdem handelt es sich bei den Derivaten bereits um Steroide, und Steroide sind besonders wichtige Grundstrukturen für die hemmende Wirkung auf ROR-Gamma.

Neben den interessanten langen Ketten mit Carboxylgruppen ist auch die tiefere Positionierung einiger IMNA-Analoga in der Bindetasche von Bedeutung. Eine solche Positionierung wurde zum Beispiel bei den Oleonolsäure-Derivaten nicht beobachtet. Je näher und tiefer eine Struktur in der Tasche liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie die Sperre zerstört und die Wirkung des Proteins hemmt.

4.4 Betulinsäure-Derivate

Aufgrund der Vielzahl biologischer und pharmakologischer Aktivitäten von Betulinsäure sowie ihrer Fähigkeit, die ROR γ -Aktivität zu inhibieren, werden ihre Struktur modifiziert und neue Derivate bzw. Liganden ausgehend von Betulinsäure synthetisiert. Die Kristallstruktur von ROR γ -LBD-SRC2 (wobei SRC2 ein koaktivierendes Peptid ist) im Komplex mit Betulinsäure wurde mit einer Auflösung von 2,45 Å gelöst. Die Position in der Bindetasche und die potenziellen Interaktionen wurden bereits im Kapitel zur Analyse der PDB-Strukturen mit inversen Agonisten beschrieben.

Die Carboxylgruppe von Betulinsäure zeigt in Richtung Helix11. Da die lange Seitenkette von Digoxin (ein inverser Agonist) genau in diese Richtung zeigt und auf diese Weise die Agonistsperre direkt aufhebt, wurde vermutet, dass durch den Einbau von hydrophoben

Gruppen unterschiedlicher Größe an R1 (das Wasserstoffatom der Carboxylgruppe) die Agonistsperre gestört oder unterbrochen werden könnte, was zu einer antagonistischen Wirkung auf ROR γ führt [2].

Dreißig verschiedene Derivate wurden synthetisiert (Mei et al., 2023) und ihre Wirkung auf ROR γ wurde sowohl experimentell als auch virtuell mittels Docking untersucht. Ausgewählte Verbindungen mit verschiedenen IC₅₀-Werten wurden mithilfe von Maestro Schrödinger 13.7 für das Docking analysiert, um den Interaktionsmodus dieser Verbindungen mit ROR γ zu untersuchen (Die ausgewählte Strukturen sind bei Abb.19 zu finden). Dabei reichte der Docking-Score bzw. der Glide-Score von -4,954 kcal/mol bis -11,449 kcal/mol, wobei ein niedrigerer negativer Wert einen besseren Docking-Score darstellt.

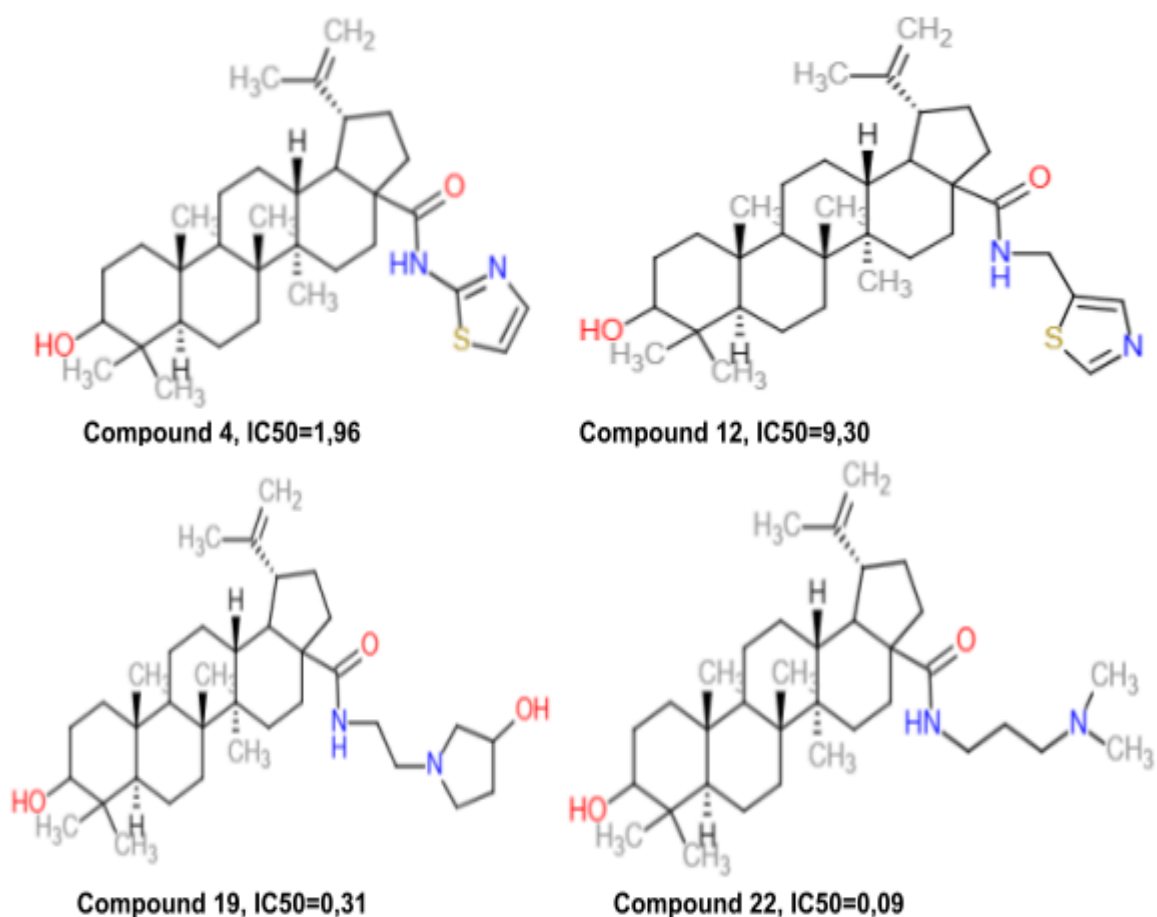


Abbildung19: ausgewählte Betulinsäure-Derivate, mit Modifikation am R1 (C28).

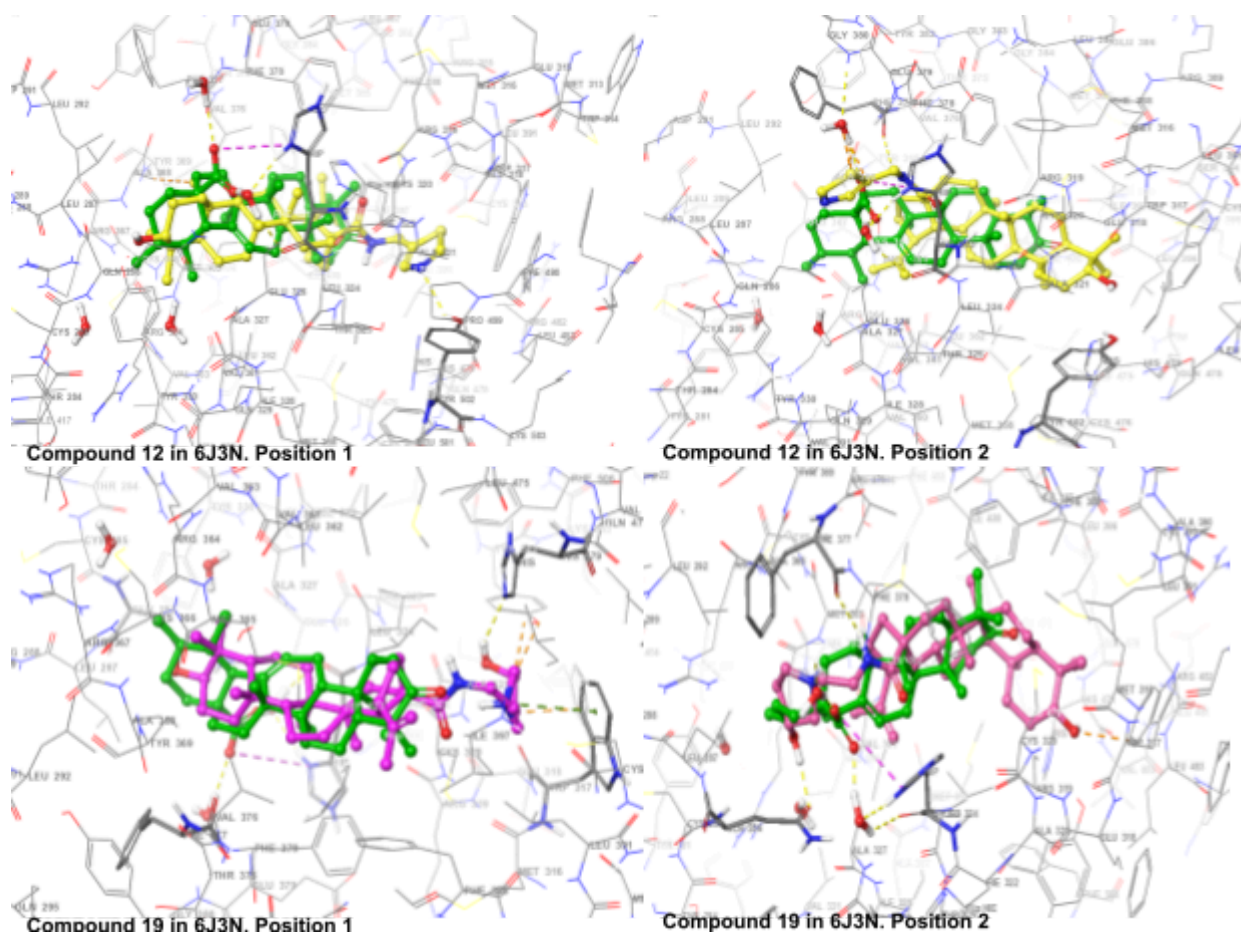


Abbildung 21: Compound 12 (gelb) und Compound 19 (rosa) in 6J3N

Basierend auf der obigen Ergebnissen wurde spekuliert, dass die Elongation des hydrophoben Gruppenlinkers bei R₁ die Affinität und Antiproliferationsaktivität der Verbindungen weiter erhöhen könnte. Bei Verlängerung der Ordnungszahl des Linkers um ein Kohlenstoffatom (ausgehend von Compound 4) entsteht Compound 12. Der Thiazolring von Compound 12 war flexibler im Vergleich zu Verbindung 4, was die Bindung der Verbindung mit ROR γ in einer optimalen Konformation förderte, jedoch war die Wirkung von Verbindung 12 auf den Agonisten-Lock abgeschwächt und die zellhemmende Aktivität war im Vergleich zu Verbindung 4 um das 5-fache verringert (Abb.21).

Interpretation der Docking-Ergebnisse:

Der Docking-Score von Verbindung 12 betrug -10,771 kcal/mol, was darauf hinweist, dass der Ligand eine starke Bindungsaffinität hat und vermutlich eine hemmende Wirkung auf ROR besitzt und hat dann die Voraussetzungen um einen inversen Agonist zu sein.

Besonders interessant ist bei dieser Verbindung, dass zwei Bindungsmodi beobachtet wurden. Im ersten Modus ist der Rest ähnlich wie bei anderen Verbindungen in Richtung der Agonistensperre positioniert, und ein zusätzliches Kohlenstoffatom verlängert den Rest, wodurch Verbindung 12 näher an die Agonistensperre gelangt. Der Thiazolring kann direkt das aktive Zentrum stören, indem er eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr502 bildet, ein Bestandteil der Agonistensperre. Im zweiten Modus nimmt der Ligand eine völlig andere Position ein, die umgekehrt ist, so dass der Rest in Richtung der Öffnung der Bindetasche ausgerichtet ist. Hier bildet das Stickstoffatom (neben der Carbonylgruppe) eine Wasserstoffbrückenbindung mit Phe377.

Aufgrund des sinnvollen Nutzens der Seitenkettenelongation wurde Compound 19 (Abb.21) synthetisiert. Im Vergleich zu Compound 12 besitzt es einen Pyrrolidinolring anstelle eines Thiazolrings und eine zusätzliche Verlängerung des Linkers um ein C-Atom. Diese Veränderungen führten zu einer erhöhten Bindeaffinität und Aktivität in vivo. Der IC_{50} -Wert ist signifikant reduziert ($IC_{50}=0,31$). Der Docking-Score ist ebenfalls hoch und beträgt -11,449 kcal/mol. Compound 19 weist auch zwei Bindungsmodi wie Compound 12 auf. An der Position, an der der Rest in Richtung der Agonistensperre zeigt, kann die Sperre direkt aufgebrochen werden, vor allem durch Wechselwirkungen mit His479, wobei die Hydroxylgruppe dafür verantwortlich ist. Der Pyrrolidinring kann eine Pi-Interaktion mit Trp317 eingehen. An Position Zwei bildet das Stickstoffatom, ähnlich wie bei Compound 12, eine Wasserstoffbrückenbindung mit Phe377. Die Hydroxylgruppe, die nur bei Compound 19 vorhanden ist, kann mit Gln286 interagieren.

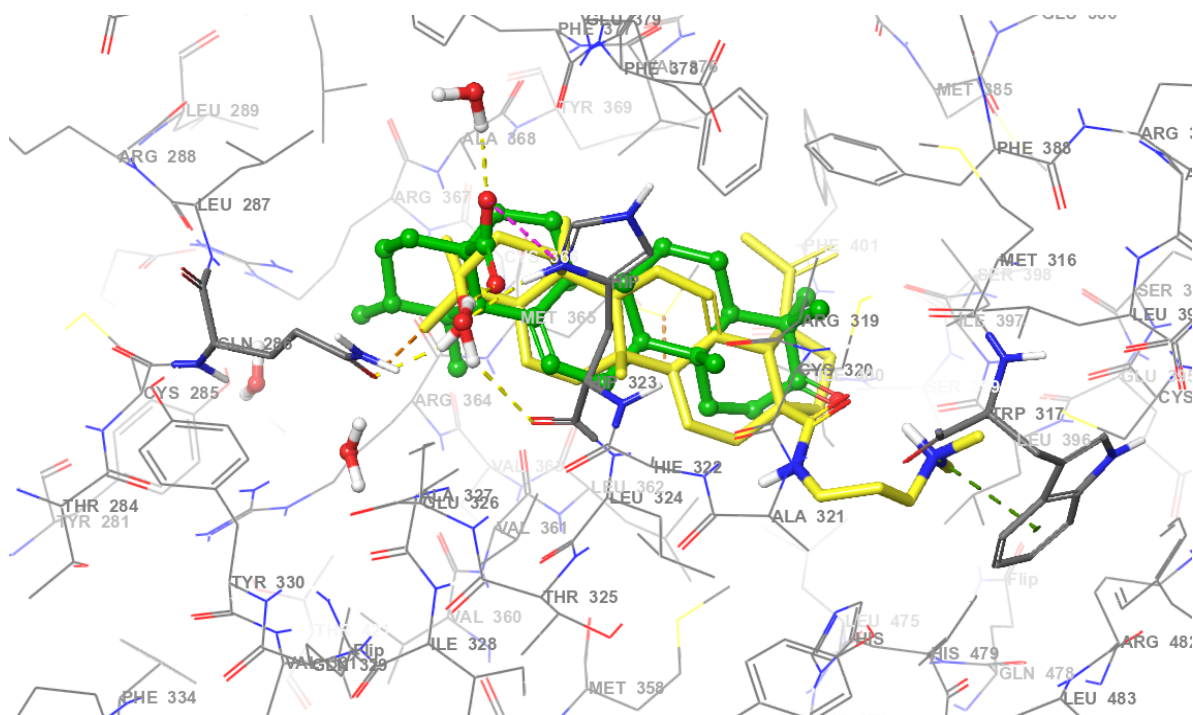


Abbildung 22: Compound 22 (gelb), Ursonsäure (grün) in 6J3N.

Basierend auf dem IC_{50} -Wert zeigt Verbindung 22 (mit Dimethylaminopropylamin als R1) mit einem Wert von 0,09 die stärkste Wirksamkeit. Ihr Docking-Score betrug -10,340 kcal/mol. Der Ligand liegt tief in der Bindetasche, wobei der vorhandene Rest 1-Dimethylaminopropylamidin in Richtung der agonistischen Sperre zeigt. Diese Positionierung ermöglicht es dem Stickstoffatom am Ende des Rests, eine π -Interaktion mit Trp317 einzugehen. Die Nähe zur Agonistensperre ergibt Sinn, da die Sperre indirekt aufgebrochen werden kann und die hemmende Wirkung folglich vorhanden ist. Auf der anderen Seite sind verschiedene Arten von Interaktionen zu beobachten: Die Hydroxylgruppe am C3 bildet über HOH701 zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit His323 und eine Wasserstoffbrückenbindung mit Gln286. (Abb.22).

Abgesehen von den Verbindungen, bei denen Substitutionen an der Carboxylgruppe durchgeführt wurden, wurde eine zweite Serie von Betulinsäure-Derivaten untersucht. In dieser Serie wurden Änderungen am Ring A vorgenommen, wobei die Hydroxylgruppe am C3 durch eine Carbonylgruppe ersetzt wurde. Hier wird vermutet, dass die vorhandene Carboxylgruppe essentiell für die Aktivität ist und daher diese funktionelle Gruppe beibehalten werden muss, während Veränderungen an anderer Stelle vorgenommen werden sollen, nämlich am Ring A. Das Einbringen eines aromatischen Systems in die Struktur des Liganden wird diesem helfen, π - π -Wechselwirkungen mit dem Protein, nämlich mit Trp317

oder mit His479 einzugehen. Dadurch kann der Ligand von beiden Seiten mit ROR interagieren, was zu einer stärkeren Hemmung führen kann.

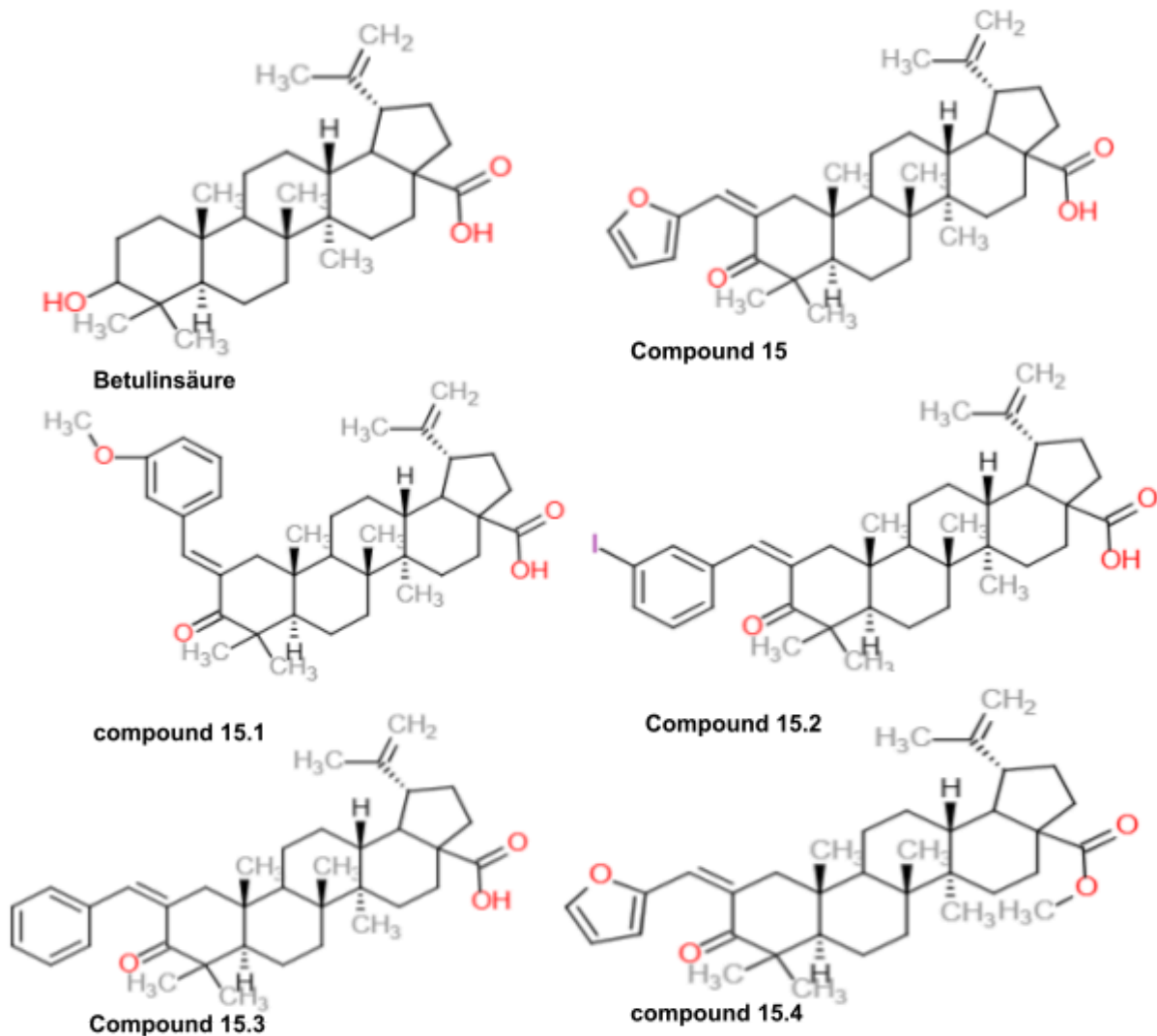


Abbildung 23: Die zweite Serie von Betulinsäure-Derivate.

Compound 15 ist ein Derivat von Betulinsäure, das am C2 eine Vinylfurangruppe und eine Carbonylgruppe anstelle der Hydroxylgruppe am C3 besitzt. Die Aktivität von Compound 15 wurde in vitro experimentell untersucht, und die Ergebnisse waren wie folgt: Der Imax-Wert wurde für Betulinsäure und Compound 15 bei einer Konzentration von 5 μM im ROR γ -Gal4-Luciferase-Assay gemessen, wobei der Wert bei Compound 15 deutlich höher war als bei Betulinsäure. Dieses Ergebnis wurde auch im ROR γ -Gal4-Luciferase-Assay in

voller Länge bestätigt. Ähnlich wie Compound 15 zeigte Betulinsäure in den Resazurin-Umwandlungstests keine zytotoxischen Wirkungen.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Compound 15 ROR γ mit relativ hoher Wirksamkeit und Effizienz hemmt, während Betulinsäure nur mäßige Auswirkungen auf ROR γ zeigt.

Diese vier Nachfolgeverbindungen unterscheiden sich von Verbindung 15 durch eine einzige Transformation: In Verbindung 15.1, 15.2 und 15.3 wird der Furanring durch eine 3-Methoxyphenyl-, 3-Iodphenyl- bzw. Phenyleinheit ersetzt. In Verbindung 15.4 wird die Carbonsäure in Verbindung 15 durch eine Methylestereinheit ersetzt. Verbindung 15.1 weist zudem eine abweichende Konfiguration der Doppelbindung in Position 2 (E) im Vergleich zu anderen Betulinsäurederivaten auf, bei denen die verfügbare Dokumentation auf eine (Z)-Konfiguration schließen lässt. Die Substitution am C2 kommt zum ersten Mal bei ROR Liganden vor und das macht diese Verbindungen besonders interessant.

Im ROR γ -Gal4-Luciferase-Assay wurde bestätigt, dass zwei der vier Folgeverbindungen (d. h. die Verbindungen 15.2 und 15.3) als inverse Agonisten von ROR γ bei einem Aktivitätsniveau wirken, das mit dem von Verbindung 15 vergleichbar ist. Verbindung 15.1 wirkte als inverse Agonist mit einer vergleichbaren Aktivität wie Betulinsäure.

Docking-Ergebnisse:

Unsere Docking-Experimente mit Glide unter Verwendung einer Röntgenkristallstruktur des menschlichen ROR γ -LBD im Komplex mit Ursolsäure, PDB-Struktur 6J3N, weisen darauf hin, dass Betulinsäure-Derivate (Verbindungen 15, 15.2, 15.3 und 15.4) wahrscheinlich den gleichen Bindungsmodus wie der inverse Agonist Ursolsäure (6J3N) haben. Der Docking-Score liegt zwischen -11,190 kcal/mol (Compound 15.4) und -12,645 kcal/mol (Compound 15.2).

Gemäß der Bindungspose wurde erwartet, dass zwischen der Carboxylgruppe der Liganden und His323 Wasserstoffbrückenbindungen gebildet werden. Diese Art der Interaktion wurde bei allen Derivaten beobachtet, mit Ausnahme von Compound 15.4, das eine Methylestergruppe aufweist. Dies unterstützt die wichtige und essentielle Rolle der Carboxylgruppe bei der Ligandenbindung.

Neben den Wechselwirkungen mit His323 wird erwartet, dass Verbindungen 15, 15.2, 15.3 und 15.4 durch ihre Furan- oder Phenyleinheiten Pi-Pi-Stacking-Wechselwirkungen mit Trp317 und His479 eingehen (Abbildung 24). Diese Interaktionen könnten die Agonistensperre His479-Tyr502-Phe506 aufbrechen, die mit der ROR γ -Transkriptionsaktivierung verbunden ist, indem sie eine geeignete Konformation für die Koaktivatorbindung ermöglichen. Es ist wichtig zu beachten, dass die beschriebenen Pi-Pi-Wechselwirkungen voraussichtlich bei Betulinsäure nicht auftreten, aufgrund des fehlenden Substituenten an Position 2, was die geringere Aktivität von Betulinsäure in den Luciferase-Assays erklären könnte.

Die geringere Aktivität von Verbindung 15.1 im Luciferase-Assay könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie eine unterschiedliche Konfiguration der Doppelbindung an Position 2 des Triterpengerüsts aufweist (E-Konfiguration im Gegensatz zur Z-Konfiguration bei allen anderen Analoga). Das Andocken legt nahe, dass das (E)-Isomer im Gegensatz zum (Z)-Isomer wahrscheinlich nicht gut in die Ligandenbindungstasche passt.

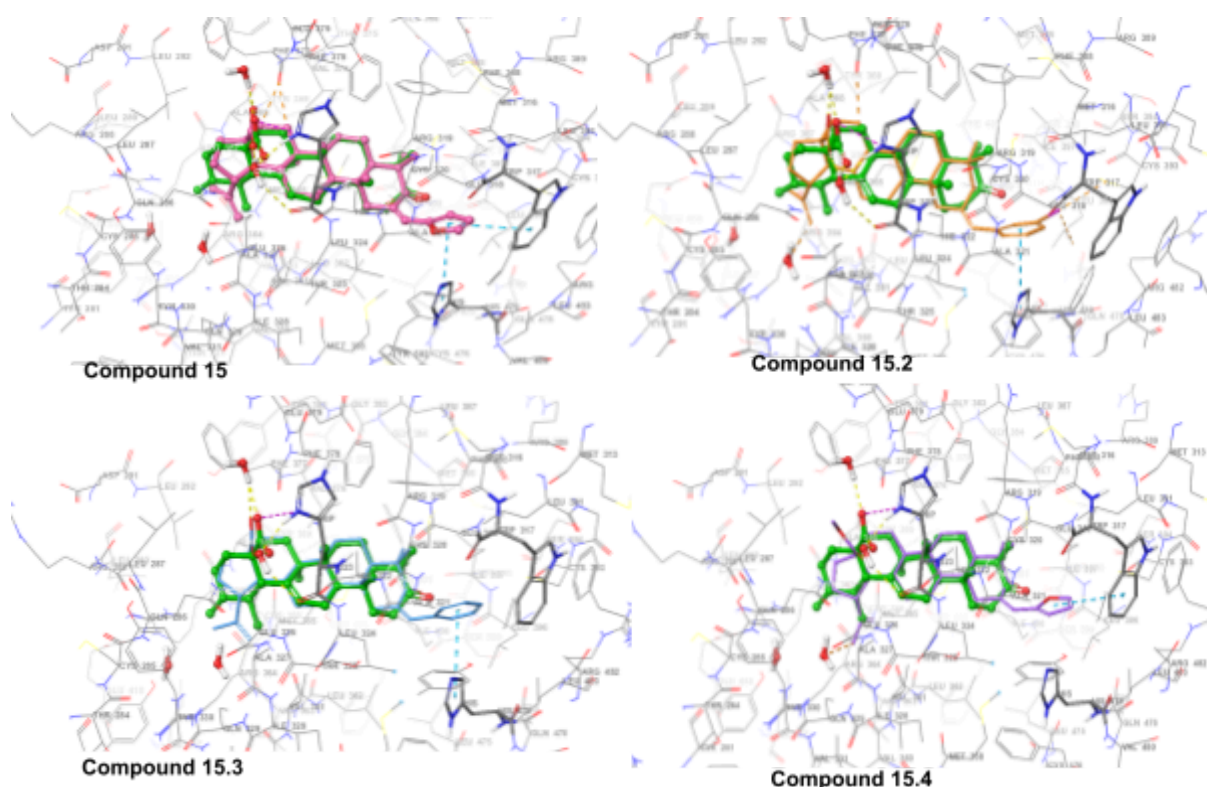


Abbildung 24: Compound 15, 15.2, 15.3 und 15.4 in 6J3N.

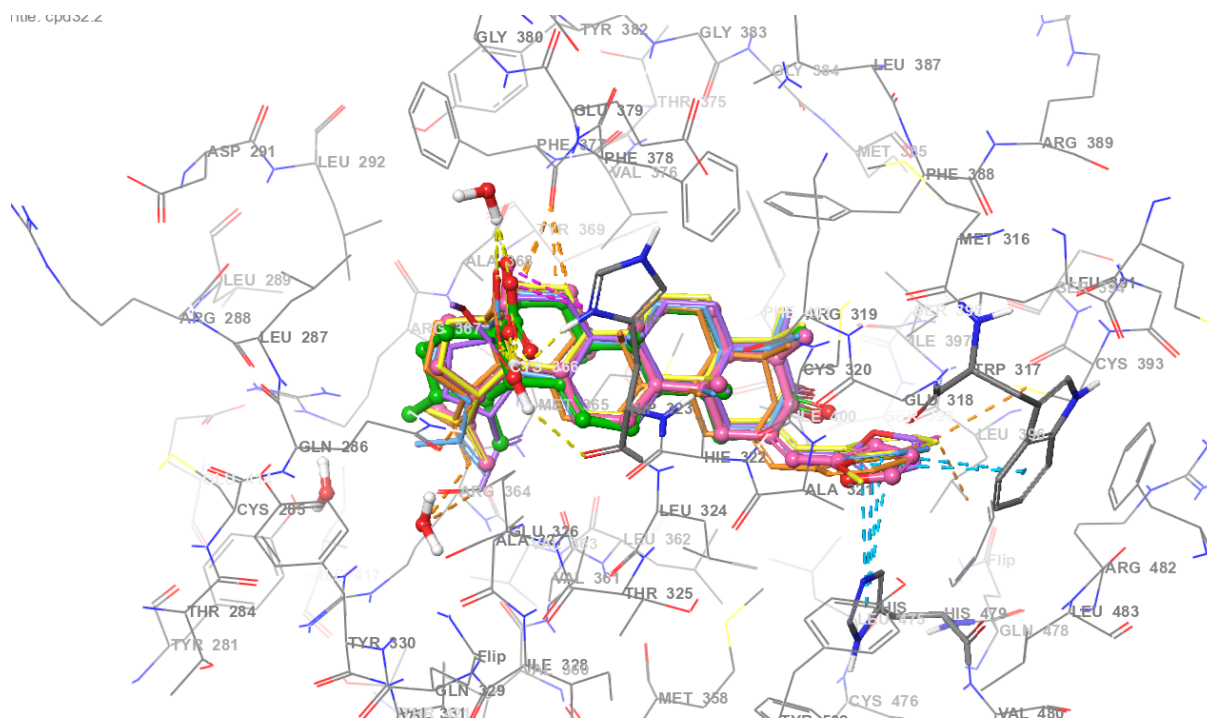


Abbildung 25: Compounds 15 bis 15.4 in 6J3N.

Schlussfolgerung:

Diese Serie ist besonders interessant, da ihre Bestandteile einerseits in der Realität einen hemmenden Effekt gezeigt haben und andererseits neue Substitutionen aufweisen, nämlich den Furanring am Ring A, und laut Dockingscore auch als aktiv gelten. In Zusammenfassung tragen die in dieser Serie vorgestellten Verbindungen dazu bei, das Repertoire der Triterpenoide als ROR γ -Modulatoren zu erweitern. Die Erkundung von Variationen bei den Substitutionen an Position 2 führt zu neuen Strukturmotiven von Betulinsäurederivaten als inverse ROR γ -Agonisten und kann somit die Entwicklung von Liganden für ROR γ aus Triterpenoiden und Steroiden voranbringen.

Es ist auch wichtig zu erwähnen, dass alle Verbindungen, die in der Arbeit behandelt werden, außer in 6J3N auch in 8GXP angedockt sind. Da die Ergebnisse bei der PDB-Koordination 6J3N deutlich besser waren, wurden nur deren Ergebnisse hier dargestellt.

5. Fazit

Die ROR γ t-Th17-Achse wird als ein entscheidender pathogener Faktor bei Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen betrachtet. ROR γ t fungiert als Transkriptionsfaktor von Th17-Zellen, indem es die Produktion von IL-17 und anderen entzündlichen oder autoimmunen Zytokinen stimuliert. Aus diesem Grund hat sich die Blockierung von ROR γ t als vielversprechende Strategie zur Behandlung dieser Krankheitszustände etabliert. Mehrere experimentelle Studien haben gezeigt, dass niedermolekulare ROR γ t-Inhibitoren eine wichtige Rolle bei der Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen spielen, darunter Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) und andere.

Die Suche nach inversen Agonisten oder Antagonisten von ROR γ t weckt starkes Interesse, und zahlreiche Forscher widmen sich der Identifizierung und Entwicklung von Modulatoren für diesen Zweck. Die Hemmung dieses Proteins bietet viele Vorteile für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, daher ist es sinnvoll, umfangreiche Experimente durchzuführen. In dieser Arbeit wurden zahlreiche Strukturen getestet, von denen fast alle aktiv mittels Docking vorhergesagt wurden. Einige der Substanzen, wie Compound 15, haben sich als besonders vielversprechend erwiesen und stellen eine neue Möglichkeiten für die Wirkstofffindung dar.

Zusammenfassend sind viele Substanzen, die Steroide oder Flavonoide sind, geeignet, um als Inverse Agonisten von ROR γ t zu fungieren. Es ist auch wichtig zu beachten, dass zukünftig synthetisierte Liganden eine Carboxylgruppe in Position 17, eine Hydroxylgruppe in Position 3, und möglicherweise auch eine lange Seitenkette in Position 20 enthalten sollten. Diese Merkmale ermöglichen es den Liganden, direkt oder indirekt mit der Agonistenbindungsstelle zu interagieren. Wie sich dies tatsächlich in der Realität darstellt, wird sich durch durchgeführte Laborexperimente herausstellen.

Bei der Durchführung der computerbasierten Analysen wurde festgestellt, dass die PDB Struktur 6J3N die beste Ausgangsstruktur für die Analyse der in dieser Arbeit analysierten Substanzen ist. Besonders interessant war der Unterschied in den Bindeposen der Liganden in 8GXP und 6J3N. Während in 8GXP der Ligand tief in der Bindetasche liegt, befinden sich Moleküle in einer anderen Position in der Bindetasche von 6J3N und liegen nicht tief in der

Tasche. Um den Unterschied zu verstehen und die Ursachen zu ermitteln, wurden beide Strukturen miteinander verglichen, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Proteinkonformation. Anschließend haben wir versucht, alle vorhandenen Liganden zu docken, und sie haben immer in beiden Strukturen angedockt, was auf die Flexibilität der Bindetasche hinweist. Allerdings wurden die Dockingergebnisse nur von 6J3N dargestellt, da sie genauer und präziser waren.

Verschiedene Moleküle wurden durch Docking-Tests untersucht, wobei fast alle eine hemmende Aktivität aufweisen können. Diese Erkenntnis legt nahe, dass Flavonoide und Steroide die besten inversen Agonisten sein könnten, da der Grundkörper der getesteten Substanzen zu diesen Verbindungsklassen gehört. Alle untersuchten Liganden weisen ähnliche chemische Merkmale auf, wie eine Carboxylgruppe, Hydroxylgruppe und/oder Carbonylgruppe, die für die Aktivität relevant sind. Von der Proteinseite aus gesehen ist das Aufbrechen der agonistischen Sperre von besonderer Bedeutung, wobei noch Aminosäuren wie Arg364, Arg367 und Phe377 eine wichtige Rolle bei den Interaktionen spielen. Die Entdeckung der Compound-15-Serie war besonders bedeutsam, da sie eine neue Substitution aufweist – nämlich den Furanring an Position 2. Diese Art der Substitution stellt eine Herausforderung dar, bringt jedoch positive Effekte hinsichtlich der hemmenden Wirkung mit sich. Dieser Effekt wurde sowohl mittels Docking als auch experimentell nachgewiesen.

Oleonolic acid-Derivate und IMNA 1 bis 16 zeigten ebenfalls eine hohe Aktivität und einen hohen Docking-Score und sind daher geeignet, als Liganden für ROR-Gamma zu fungieren. Es wurde festgestellt, dass die Carboxylgruppe bei allen Serien außer den Betulinsäure-Derivaten (Abbildung 19), bei denen sie substituiert wurde, eine essenzielle Rolle spielt. Daher spielen die Betulinsäure-Derivate der Serie 1 eine untergeordnete Rolle in diesem Bereich.

Es bleibt spannend zu sehen, welche Gruppe von Verbindungen in Zukunft weiter untersucht und strukturell optimiert wird. Die Frage, ob weitere Erkenntnisse gewonnen werden, bleibt offen und wird möglicherweise erst in den kommenden Tagen oder sogar Jahren beantwortet.

Quellen:

- [1] Pandya u. a., „Combating Autoimmune Diseases With Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor- γ (ROR γ or RORc) Inhibitors“. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 24, 10976–10995, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00588.
- [2] Mei L, Xu L, Wu S, Wang Y, Xu C, Wang L, Zhang X, Yu C, Jiang H, Zhang X, Bai F, Xie C., „Discovery, structural optimization, and anti-tumor bioactivity evaluations of betulinic acid derivatives as a new type of ROR γ antagonists“. *Eur. J. Med. Chem.* 2023, 5, 257:115472, doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115472.
- [3] Zeng u. a., „Small Molecule Inhibitors of ROR γ t for Th17 Regulation in Inflammatory and Autoimmune Diseases“. *J. Pharm. Anal.* 2023, 545-562, doi: 10.1016/j.jpha.2023.05.009.
- [4] Pelletier u. a., „Evidence for a Cross-Talk between Human Neutrophils and Th17 Cells“. *Blood* 2010, 115, 335-43, doi: 10.1182/blood-2009-04-216085.
- [5] Singh u. a., „Th17 Cells in Inflammation and Autoimmunity“. *Autoimmun. Rev.* 2014, 13, 12, 1174-81, doi: 10.1016/j.autrev.2014.08.019.
- [6] Sun u. a., „Agonist Lock Touched and Untouched Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor- Γ t (ROR γ t) Inverse Agonists“. *J. Med. Chem.* 2021, 64, 15, 10519–10536, doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c02178.
- [7] Song CM, Lim SJ, Tong JC, „Recent advances in computer-aided drug design“. *Brief. Bioinform.* 2009, 10, 5, 579–591, doi:10.1093/bib/bbp023.
- [8] Macalino SJ, Gosu V, Hong S, Choi S., „Role of computer-aided drug design in modern drug discovery“. *Arch. Pharm. Res.* 2015, 38, 9, 1686-701, doi: 10.1007/S12272-015-0640-5.
- [9] Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD., „Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies“. *Molecules* 2015, 20, 7, 13384-421, doi: 10.3390/molecules200713384.
- [10] Huang SY, Zou X., „Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking“. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 8, 3016-34, doi: 10.3390/IJMS11083016.
- [11] Alogheli u. a., „Docking of Macrocycles“. *J. Chem. Inf. Model.* 2017, 57, 2, 190–202, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00443.
- [12] Cyr, Bronner, und Crawford, „Recent Progress on Nuclear Receptor ROR γ Modulators“. 2016, 4387-4393, doi: 10.1016/j.bmcl.2016.08.012.
- [13] Maneksha S, Harry TV., „Lorazepam bei sexuellen Störungen“. *Br. J. Clin. Pract.* 1975, 29, 7, 175-6.

- [14] Jin u. a., „Structural Basis for Hydroxycholesterols as Natural Ligands of Orphan Nuclear Receptor ROR γ “. *Mol. Endocrinol.* 2010, 24, 5, 923–929, doi: 10.1210/me.2009-0507.
- [15] Ladurner A, Schwarz PF, Dirsch VM., „Natural products as modulators of retinoic acid receptor-related orphan receptors (RORs)“. *Nat. Prod. Rep.* 2021, 38, 4, 757-781, doi: 10.1039/D0NP00047G.
- [16] Helleboid S, Haug C, Lamottke K, Zhou Y, Wei J, Daix S, Cambula L, Rigou G, Hum DW, Walczak R., „The Identification of Naturally Occurring Neoruscogenin as a Bioavailable, Potent, and High-Affinity Agonist of the Nuclear Receptor ROR α (NR1F1)“. *SLAS Discovery.* 2014, 19, 3, 399-406, doi: 10.1177/1087057113497095.
- [17] Shiming Li, Hong Wang, Limin Guo, Hui Zhao, Chi-Tang Ho, „Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites“. *J. Funct. Foods.* 2014, 2-10, ISSN 1756-4646, doi: 10.1016/j.jff.2013.12.011.
- [18] Latscha, H.P., Kazmaier, U. Steroid. In: Chemie für Biologen. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2016, doi: 10.1007/978-3-662-47784-7_46.
- [19] Shirai u. a., „Discovery of Orally Efficacious ROR γ t Inverse Agonists, Part 1: Identification of novel phenylglycinamides as lead scaffolds“. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2018, 26, 2, 483-500, doi: 10.1016/j.bmc.2017.12.006.
- [20] Xu u. a., „Ursolic Acid Suppresses Interleukin-17 (IL-17) Production by Selectively Antagonizing the Function of ROR γ t Protein“. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 26, 22707-22710, doi: 10.1074/jbc.C111.250407.
- [21] Fujita-Sato S, Ito S, Isobe T, Ohyama T, Wakabayashi K, Morishita K, Ando O, Isono F., „Structural basis of digoxin that antagonizes ROR γ t receptor activity and suppresses Th17 cell differentiation and interleukin (IL)-17 production“. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 36, 31409-17, doi: 10.1074/jbc.M111.254003.
- [22] Gómez-Bouzó u. a., „Development of Novel Gemini-Cholesterol Analogues for Retinoid-Related Orphan Receptors“. *Org. Chem. Front.* 2022, 9,6, 1522-1530, doi:10.1039/D2QO00040G.
- [23] Santori FR, Huang P, van de Pavert SA, Douglass EF Jr, Leaver DJ, Haubrich BA, Keber R, Lorbek G, Konijn T, Rosales BN, Rozman D, Horvat S, Rahier A, Mebius RE, Rastinejad F, Nes WD, Littman DR., „Identification of natural ROR γ ligands that regulate the development of lymphoid cells“. *Cell. Metab.* 2015, 21, 2, 286-298, doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.004.

- [24] Kallen J, Izaac A, Be C, Arista L, Orain D, Kaupmann K, Guntermann C, Hoegenauer K, Hintermann S., „Structural States of ROR γ : X-ray Elucidation of Molecular Mechanisms and Binding Interactions for Natural and Synthetic Compounds“. *Chem. Med. Chem.* 2017, 12,13, 1014-1021, doi: 10.1002/cmdc.201700278.
- [25] Noguchi u. a., „Ternary Complex of Human ROR γ ligand-binding domain, inverse agonist and SMRT peptide shows a unique mechanism of corepressor recruitment“. *Genes Cells.* 2017, 22, 6, 535-551, doi: 10.1111/gtc.12494.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit im Masterstudiengang Pharmazie eigenständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Textpassage, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikation oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ich versichere noch, dass die eingereichte schriftliche Fassung der auf dem elektronischen Speichermedium entspricht.

Deklaration über die Verwendung eines generativen KI-Tools

Die Autorin hat ChatGPT Version 3.5 für sprachliche Verbesserungen verwendet. Nach Verwendung dieses Modells hat die Autorin den Inhalt überprüft und, wo erforderlich, überarbeitet. Sie übernimmt die volle Verantwortung für den Inhalt der Veröffentlichung.

Ort, Datum

Unterschrift

