

Streszczenie

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) choroby pasożytnicze są jednym z głównych zagrożeń dla zdrowia i dobrobytu ludzi na całym świecie. W regionach tropikalnych i subtropikalnych konsekwencje infekcji pasożytniczych, takich jak choroba Chagasa wywoływana przez *Trypanosoma cruzi* i afrykańska śpiączka wywoływana przez *Trypanosoma brucei*, są druzgocące zarówno pod względem zachorowalności, jak i śmiertelności ludzi. Obecnie dostępne leki są ograniczone, często nieskuteczne i wymagają długich schematów leczenia, co powoduje znaczące skutki uboczne i pojawienie się oporności na leki. Aby przezwyciężyć te ograniczenia, pilnie potrzebna jest identyfikacja nowych makrocząsteczkowych celów dla leków i małocząsteczkowych modulatorów.

W przeciwieństwie do ssaczy odpowiedników, u trypanosomatoidów podstawowy proces metaboliczny glikolizy - jedyne źródło ATP na pewnych stadiach rozwoju pasożytów - jest kompartmentalizowany w wyspecjalizowanych peroksysomach zwanych glikosomami. Ze względu na brak zdolności do produkcji DNA i białek w tej organelli, białka glikosomalne są syntetyzowane w cytozolu na wolnych rybosomach i transportowane do przedziału glikosomalnego. Import białek glikosomalnych odbywa się za pośrednictwem wyspecjalizowanych białek zwanych peroksynami (lub PEX). W szczególności, PEX5 i PEX14 - oba będące przedmiotem niniejszej pracy - są centralnymi elementami maszynery translokacyjnej dla enzymów matrycy glikosomalnej. Większość enzymów kierowanych do glikosomów niesie peroksysomalny sygnał docelowy (PTS) i są one rozpoznawane w cytozolu przez receptor PEX5. Obciążony ładunkiem receptor wiąże związany z błoną PEX14. Interakcja PEX5 z PEX14 obejmuje krótkie motywy sekwencyjne (WxxxF) w N-końcowym regionie PEX5, który wiąże się z małą globularną domeną w N-końcowym regionie PEX14. W wyniku tej interakcji dochodzi do utworzenia dynamicznego, przejściowego kanału importowego, który umożliwia translokację ładunku do glikosomu. Choć białka PEX biorą również udział w rozwoju peroksysomów u ssaków, to szlaki te nie są niezbędne do przeżycia. Co więcej, poziom zachowania sekwencji pomiędzy tymi gatunkami jest niski. Z powyższych powodów

PEX są cennym celem molekularnym w walce z trypanosomozą. Ostatnie badania wykazały, że hamowanie PEX14 za pomocą inhibitorów małych cząsteczek selektywnie zabija trypanosomy w zwierzęcym modelu infekcji. To przełomowe odkrycie stworzyło podstawy do opracowania nowych terapii przeciwko trypanosomatozie.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów importu białek glikosomalnych. Aby osiągnąć ten cel, zastosowaliśmy multidyscyplinarne podejście obejmujące integracyjną biologię strukturalną i chemię medyczną.

W niniejszej pracy przedstawiono i przedyskutowano strukturę rentgenowską inhibitora o niskiej mikromolarnej aktywności trypanocydalnej w kompleksie z TbPEX14 oraz analizę roli sieci wodnej w interakcji białko-białko (PPI) PEX14-PEX5. Wykazano, że modulacja sieci wodnej może wpływać na siłę wiązania i selektywność inhibitorów, a więc musi być brana pod uwagę podczas optymalizacji inhibitorów. Ponadto, za pomocą AlphaScreen-based HTS zidentyfikowano nowe rusztowanie dibenzo[b,f][1,4]oksazepin-11(10H)-onowe dla małych cząsteczkowych inhibitorów PPI PEX14-PEX5. W wyniku optymalizacji chemii medycznej, na podstawie struktury rentgenowskiej TcPEX14 w kompleksie z zidentyfikowanym związkiem, otrzymano szereg pochodnych dibenzo[b,f][1,4]oksazepiny-11(10H)-onu, umożliwiających wstępną analizę SAR.

W celu zahamowania transportu glikosomalnego zidentyfikowano także kolejny podstawowy PPI, PEX5-PTS1, potencjalny cel do projektowania leków przeciw pasożytniczych. TcPEX5 w kompleksie z PTS1 został skryształizowany w celu uzyskania podstawowych informacji strukturalnych i ukierunkowania procesu projektowania inhibitorów. Opracowano i zoptymalizowano test polaryzacji fluorescencji (FP), który wykorzystano do badania biblioteki związków. Pozytywne wyniki HTS były dalej oceniane za pomocą 2D NMR opartego na białkach, testu AlphaScreen i testu opartego na komórkach.

Wyniki przedstawione w tej pracy przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat hamowania importu białek glikosomalnych za pomocą małych cząsteczkowych inhibitorów dwóch kluczowych PPI (PEX14-PEX5 i PEX5-PTS1), co stanowi obiecujący punkt wyjścia do opracowania nowych leków przeciw trypanosomatozom.

Signed by /
Podpisano przez:

 Grzegorz Dubin

Date / Data:
2022-02-10 15:39



Abstract

According to the World Health Organization (WHO) parasitic diseases are amongst the foremost threats to human health and welfare around the world. In tropical and subtropical regions, the consequences of parasitic infections, such as Chagas disease caused by *Trypanosoma cruzi* and African sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei*, are devastating both in terms of human morbidity and mortality. The currently available drugs are limited, often ineffective, and require long treatment regimens resulting in significant side effects and the emergence of drug resistance. To overcome these limitations, the identification of new macromolecular drug targets and small-molecule modulators is urgently needed.

In contrast with mammalian counterpart, in trypanosomatids the fundamental metabolic process of glycolysis – the only source of ATP in the parasites - is compartmentalized in specialized peroxisomes called glycosomes. Due to the lack of DNA and protein production abilities of this organelle, the glycosomal proteins are synthesized in the cytosol on free ribosomes and are transported into the glycosomal compartment. The glycosomal protein import is mediated through specialized proteins called peroxins (or PEX). In particular, PEX5 and PEX14 - both focus of this thesis- are central components of the translocation machinery for glycosomal matrix enzymes. Majority of enzymes addressed to the glycosomal matrix carry the peroxisomal targeting signal (PTS) and they are recognized in the cytosol by the receptor PEX5. The cargo loaded receptor binds the membrane-associated PEX14. The interaction of PEX5 with PEX14 involves a short sequence motif (WxxxF) in the N-terminal region of PEX5, which binds to a small globular domain in the N-terminal region of PEX14. This interaction results in the formation of a dynamic transient import pore, which allows the translocation of the cargo into the glycosome. Although PEX proteins also take part in mammalian peroxisome development, this latter is not essential for survival. Moreover, the level of sequence conservation between the species is low. For all the above reasons, PEX are valuable target against trypanosomiasis. Indeed, recent studies have demonstrated that targeting PEX14 with small molecule inhibitors selectively kills trypanosomes in

an animal infection model. This breakthrough finding laid the groundwork for the development of new therapies against trypanosomiasis.

The aim of this PhD work was the development of small molecule inhibitors of glycosomal protein import. In order to achieve this goal, we used a multidisciplinary approach including integrative structural biology and medicinal chemistry.

In this thesis the X-ray structure of the first inhibitor with low micromolar trypanocidal activity in complex with *Tb*PEX14 and a deep analysis of the role of the water network in the PEX14-PEX5 protein-protein interaction (PPI) have been presented and discussed. It has been shown that modulation of the water network could actually affect the binding potency and the selectivity of the inhibitors and so it has to be taken into consideration during inhibitor optimization. Moreover, a novel dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-11(10H)-one scaffold for small molecule inhibitors of PEX14-PEX5 PPI has been identified *via* AlphaScreen-based HTS. A medicinal chemistry optimization guided by X-ray structure of *Tc*PEX14 in complex with the hit compound yielded a number of dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-11(10H)-one derivatives allowing initial SAR analysis.

With the aim of inhibiting the glycosomal protein import, another fundamental PPI, PEX5-PTS1, has been evaluated as potential target for antiparasitic drug design. *Tc*PEX5 in complex with PTS1 was crystallized to obtain basic structural information and guide inhibitor design process. A fluorescence polarization (FP) assay was developed and optimized and used to screen a library of compounds. The positive hits in the HTS were further evaluated *via* 2D protein-based NMR, dose-dependent AlphaScreen and cell-based assay.

The results presented in this thesis contributed to widening the knowledge about the inhibition of glycosomal protein import using small molecule inhibitors of two crucial PPIs (PEX14-PEX5 and PEX5-PTS1) providing a promising starting point for development of new drug candidates to tackle Trypanosomiasis.

Signed by /
Podpisano przez:

 Grzegorz Dubin

Date / Data:
2022-02-10 15:39

