

**PEDRO HENRIQUE SCARPELLI PEREIRA**

**Estudo da expressão de proteínas de fissão mitocondrial, do mecanismo de ação do receptor serpentino 12, e da azitromicina como componente de terapias combinadas contra cepas multirresistentes de *Plasmodium falciparum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**São Paulo**

**2020**

## RESUMO

PEREIRA, P.H.S. Estudo da expressão de proteínas de fissão mitocondrial, do mecanismo de ação do receptor serpentina 12, e da azitromicina como componente de terapias combinadas contra cepas multirresistentes de *Plasmodium falciparum*. 2020. 206 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro). Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nesta tese abordamos tópicos importantes para conhecimento de aspectos moleculares que regulam o desenvolvimento do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária. Para isto, estudamos três genes que codificam proteínas homólogas às de mamíferos FIS1 e DRP1 envolvidos na fissão mitocondrial. Estas proteínas possuem um padrão distinto de expressão ao longo do ciclo eritrocítico de *P. falciparum* e são moduladas pelo hormônio hospedeiro melatonina. O nocaute do gene da Proteína Quinase 7 (PfPK7) resulta em alterações na expressão dos genes de fissão mitocondrial, e a perda da modulação por melatonina. Comparamos as características morfológicas e as propriedades de consumo de oxigênio de mitocôndrias de *P. falciparum* em parasitas do tipo selvagem e linhagens PfPK7-. As características funcionais da mitocôndria são alteradas em parasitas PfPK7-, sugerindo que essa enzima desempenha um papel no controle da morfogênese mitocondrial e maturação durante a progressão do ciclo celular. Outro aspecto investigado visou identificar o ligante e modo de ação do receptor serpentina 12 de *P. falciparum* (PfSR12). Nossos dados indicam que há um aumento da concentração citosólica de cálcio em células HEK293 transfectadas com PfSR12 com a adição de trombina, e essa sinalização é dependente da via de sinalização envolvendo a proteína G pertencente à família G<sub>q/11</sub>. Utilizando biosensores baseados em BRET, demonstramos a formação de DAG e atividade da PKC no processo de ativação do PfSR12 por trombina. No entanto, nossos dados indicam que a transfecção do PfSR12 leva a um aumento do número de receptores endógenos presentes nas células HEK293 e, portanto, a sinalização observada pode não ser devida ao PfSR12. Por último, investigamos uma questão importante relacionada ao tratamento de parasitas multirresistentes de *P. falciparum*. Relatamos a avaliação da azitromicina (AZ) como candidata à terapia combinada com outros antimaláricos em cepas multirresistentes. Os ensaios mostraram que as linhagens multirresistentes mais resistentes à AZ do que as linhagens sensíveis. Isobogramas mostraram evidência de antagonismo quando a AZ foi testada em combinação com piperaquina, cloroquina e dihidroartemisinina em cepas sensíveis ao AZ. Nossos dados fornecem evidências *in vitro* de que o AZ não seria útil no tratamento da malária em regiões onde estão presentes parasitas multirresistentes.

Palavras Chave: *Plasmodium*, malária, GPCR, mitocôndria, antimaláricos.

## Abstract

PEREIRA, P.H.S. Study of Mitochondrial protein expression, serpentine receptor 12 mechanism of action, and azithromycin as a component of combined therapies against multiresistant *Plasmodium falciparum* strains. 2020. 206 f. PhD Thesis (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro). Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this thesis we cover important topics for knowledge of molecular aspects that regulate the development of *Plasmodium falciparum*, etiological agent of malaria. We studied three genes encoding homologous proteins to mammalian FIS1 and DRP1, involved in mitochondrial fission. These proteins have a distinct pattern of expression throughout *P. falciparum* erythrocyte cycle and are modulated by the host hormone melatonin. The knockout of Protein Kinase 7 gene (PfPK7) results in changes in mitochondrial fission gene expression, and loss of melatonin modulation. We compared the morphological characteristics and oxygen consumption properties of *P. falciparum* mitochondria in wild type parasites and PfPK7- strains. The functional characteristics of mitochondria are altered in PfPK7- parasites, suggesting that this enzyme plays a role in controlling mitochondrial morphogenesis and maturation during cell cycle progression. Another aspect investigated aimed to identify the ligand and mode of action of *P. falciparum* serpentine receptor 12 (PfSR12). Our data indicate that there is an increase in cytosolic calcium concentration in PfSR12 transfected HEK293 cells with the addition of thrombin, and this signaling is dependent on the signaling pathway involving the G<sub>q/11</sub> family of G proteins. Using BRET-based biosensors we demonstrate the formation of DAG and PKC activity in the process of PfSR12 activation by thrombin. However, our data indicate that PfSR12 transfection leads to an increase in the number of endogenous receptors present in HEK293 cells and therefore the observed signaling may not be due to PfSR12. Finally, we investigated an important issue related to the treatment of multiresistant *P. falciparum* parasites. We report the evaluation of azithromycin (AZ) as a candidate for combination therapy with other antimalarials in multiresistant strains. Our tests have shown that multiresistant strains are more resistant to AZ than sensitive strains. Isobolograms showed evidence of antagonism when AZ was tested in combination with piperazine, chloroquine and dihydroartemisinin in AZ sensitive strains. Our data provide in vitro evidence that AZ would not be useful in treating malaria in regions where multidrug resistant parasites are present.

Keywords: *Plasmodium*, malaria, GPCR, mitochondria, antimalarials.