UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Ketllyn Irene Zagato de Oliveira

Biologia estrutural e busca por inibidores da proteína não-estrutural NS5
domínio RNA polimerase dependente de RNA do vírus Zika

São Carlos
2021

KETLLYN IRENE ZAGATO DE OLIVEIRA

Biologia estrutural e busca por inibidores da proteína não-estrutural NS5
domínio RNA polimerase dependente de RNA do vírus Zika

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Glaucius Oliva

Versão Original

São Carlos
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Ketllyn Irene Zagato de
Biologia estrutural e busca por inibidores da proteína
não-estrutural NS5 domínio RNA polimerase dependente de
RNA do vírus Zika / Ketllyn Irene Zagato de Oliveira;
orientador Glaucius Oliva -- São Carlos, 2021.
99 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física
Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2021.

1. Flavííirus . 2. Zika vírus. 3. RNA polimerase
dependente de RNA. I. Oliva, Glaucius, orient. II. Título.

Folha de Aprovação

Verso da folha de aprovação

Dedico este trabalho à minha sogra Ivanilde e ao meu tio Gerson,
que me deixaram recentemente, mas que foram fundamentais,
para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade desta vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, e por ter sido o meu suporte sempre.

Ao meu companheiro de vida Wellington, pela paciência, incentivo e por estar ao meu lado, não me deixando desistir jamais, muitas vezes acreditando muito mais em mim do que eu mesma.

Aos meus pais, Rovilson e Francisca, que não mediram esforços para que eu tivesse acesso as melhores opções educacionais, o que me possibilitou melhores oportunidades. E a minha irmã, Kevllyn pelo apoio ao longo da vida. Sou grata por tudo que fizeram por mim.

Ao Prof. Dr. Glaucius, pela oportunidade e pela orientação. Durante esse processo, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Aos meus amigos de laboratório (Guilherme, Juliana, Camila Z., Gabriela, Victor O., Camila T., Camila B. e Victor R.) que me acompanharam nos almoços de todos os dias, vocês me ajudaram e me alegraram durante esse doutorado. Nossos almoços foram regados a muitas risadas e discussões científicas que contribuíram para esse trabalho. E em especial a Naiara por todo incentivo, apoio e por ter sido uma luz durante meu doutorado.

Às Dras. Caroline e Nathalya, por todos os ensinamentos e paciência, com vocês aprendi muito sobre a ciência e a humildade.

Aos Drs. André, Rafaela, Renata, Amanda e Fernando Maluf e a Marjorie por todos os ensinamentos e ajuda durante esse processo.

Aos técnicos da Biofísica Andressa, Fernando, Rafael, em especial, à Bel, e aos técnicos da cristalografia Humberto e Suzana, pelo suporte, ensinamentos e cafés.

Às minhas amigas Thais, Larissa, Lhaís e Catharina por todo apoio e suporte durante esse processo.

Aos Profs. Drs. Marcio e Rafael, pelas oportunidades e discussões onde foi possível muito aprendizado.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Doutorado Direto (Processos 2016/17153-2 e 2018/19574-0) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos os professores que passaram pela minha vida, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui, em especial à Dras. Cintia Matiucci Pereira e Andreia Pereira Matos, que me apresentaram às possibilidades acadêmicas.

E por fim a todos aqueles amigos e familiares que de forma direta ou indireta colaboraram para que esse sonho fosse possível.

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se
você não fizer nada, não existirão resultados.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

OLIVEIRA, K. I. Z. **Biologia estrutural e busca por inibidores da proteína não-estrutural NS5 domínio RNA polimerase dependente de RNA do vírus Zika**. 2021. 99 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

O vírus Zika (ZIKV) é um membro da família *Flaviviridae* que teve a primeira ocorrência relatada no Brasil em abril de 2015. O maior impacto do ZIKV ocorreu devido a sua associação com o aumento no número de casos de microcefalia em bebês e fetos de gestantes infectadas com o vírus durante a epidemia que ocorreu no Brasil entre 2015 e 2016. Desde então, mais de 240.000 casos de febre Zika foram notificados no país, sendo 10.768 casos registrados no ano de 2019 e 6.705 casos prováveis no ano de 2020. Diante desses fatos, muitos estudos encontram-se em andamento para a busca de candidatos a fármacos eficazes contra o ZIKV. Dentre as proteínas não estruturais, a NS5 desperta grande interesse como alvo farmacológico, devido a já existir um inibidor de NS5 domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) aprovado para uso clínico contra o vírus da Hepatite C. A RdRp é responsável pela síntese de RNA *de novo*, ou seja, sem a necessidade de um primer para o início da síntese. Promove a elongação do RNA viral, através da polimerização fazendo o uso de NTPs, garantindo assim a replicação viral. A inibição de qualquer uma dessas funções acarretaria o impedimento da replicação viral. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi obter a proteína NS5 do ZIKV domínio RdRp a fim de determinar a sua estrutura tridimensional por cristalografia de raios X, seguida da descoberta de inibidores. Para isso, planejamos duas construções para a proteína NS5 RdRp: a RdRp_truncada e a RdRp_integral. Com a RdRp_truncada foi possível obter cristais que produziram difração de raios X, o que possibilitou a resolução da estrutura cristalográfica da NS5 domínio RdRp a 1.9 Å. Essa estrutura foi utilizada para realizar a triagem computacional de inibidores, assim como ensaios biofísicos para a busca de possíveis ligantes. Com a RdRp_integral, foi possível a padronização de um ensaio baseado no marcador fluorescente de ácido nucleico SYBR Green I, que monitora a atividade da proteína em tempo real, e que foi utilizado na busca por inibidores em larga escala. Foi possível triar a inibição de mais de 500 compostos, incluindo a biblioteca de compostos “drug-like” da Pandemic Response Box (Medicines for Malaria Venture - MMV) (PRB), e os compostos sintéticos e provenientes de produtos naturais que foram encontrados por triagem biofísica e virtual. Ao todo, foram identificados 17 potenciais inibidores da NS5 RdRp, sendo que 9 deles apresentaram inibição na faixa micromolar ($IC_{50} \leq 10 \mu M$) e 5 deles apresentaram inibição na faixa nanomolar ($IC_{50} \leq 1 \mu M$). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, apesar da ausência de estruturas cristalográficas complexadas com ligantes, foi possível encontrar moléculas com alta inibição, que podem ter sua ação otimizada por ensaios computacionais e posteriormente testadas contra a RdRp. Dentre elas, os compostos provenientes de produtos naturais que se mostraram extremamente interessantes, em especial os derivados do anel flavonol, que se mostram potentes na inibição da atividade da RdRp.

Palavras-chave: Flavivírus. Zika vírus. RNA polimerase dependente de RNA.

ABSTRACT

OLIVEIRA, K. I. Z. **Structural biology and search for inhibitors of the non-structural protein NS5 RNA-dependent RNA polymerase domain of the Zika virus**. 2021. 99 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

The Zika virus (ZIKV) is a member of the *Flaviviridae* family that was first reported in Brazil in April 2015. The major impact of ZIKV was due to its association with the increase in the number of microcephaly cases reported in newborns of pregnant women infected with the virus during the epidemic that occurred in Brazil between 2015 and 2016. Since then, more than 240.000 cases of Zika fever have been reported in the country, with 10.768 cases registered in 2019 and 6.705 probable cases in 2020. Given these facts, many studies are underway to search for candidates for effective drugs against ZIKV. Among the ZIKV non-structural proteins, NS5 is of great interest as a pharmacological target, due to the existence of an inhibitor approved for clinical use against the Hepatitis C virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase domain (RdRp). RdRp is responsible for the *de novo* synthesis of viral RNA, that is, without the need for a primer to start the synthesis. It promotes the elongation of viral RNA, through polymerization using NTPs, thus guaranteeing viral replication. Inhibition of any of these functions would prevent viral replication. In this context, the objective of this project was to obtain the NS5 RdRp domain from the ZIKV in order to determine its three-dimensional structure by X-ray crystallography, followed by the discovery of inhibitors. For this purpose, we designed two constructions for the NS5 RdRp protein: the RdRp_truncated and the RdRp_integral. With the RdRp_truncated, it was possible to obtain crystals that produced X-ray diffraction, which enabled the elucidation of the crystallographic structure of the NS5 RdRp domain at 1.9 Å resolution. This structure was used to perform a computational screening of inhibitors as well as biophysical assays to search for possible ligands. With RdRp_integral, it was possible to standardize an assay based on the fluorescent nucleic acid marker SYBR Green I, which monitors the activity of the protein in real time, and which was used in the extended search for inhibitors. It was possible to test the inhibition of more than 500 compounds, including the drug-like compound library *Pandemic Response Box* (PRB, Medicines for Malaria Venture - MMV), as well as synthetic compounds and natural products that were previously identified by biophysical methods and virtual screening. In all, 17 potential NS5 RdRp inhibitors were identified, with 9 of them showing inhibition in the micromolar range ($IC_{50} \leq 10 \mu M$) and 5 of them showing inhibition in the nanomolar range ($IC_{50} \leq 1 \mu M$). The results obtained in this work demonstrate that despite the absence of crystallographic structures complexed with ligands, it was possible to find molecules with high inhibition, which can have their action optimized by computational approaches and subsequently tested against the ZIKV NS5 RdRp. Among them, the natural products that have shown good RdRp inhibitory activity seem to be very promising for further studies, particularly those derived from the flavonol ring.

Keywords: Flavivirus. Zika vírus. NS5 RNA-dependent RNA polymerase domain.