

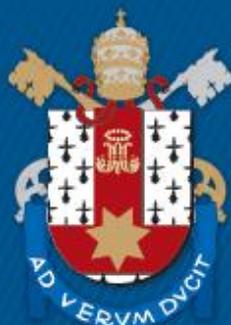
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUCAS SANTOS CHITOLINA

**ESTUDO *IN SILICO*, POR DINÂMICA MOLECULAR CLÁSSICA, DA ESTRUTURA
TERCIÁRIA DA ENZIMA MTINHA (EC 1.3.1.9) DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* SOB
RESTRIÇÕES DA ESTRUTURA QUATERNÁRIA**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA

LUCAS SANTOS CHITOLINA

Estudo *in silico*, por dinâmica molecular clássica, da estrutura terciária da enzima MtInhA (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* sob restrições da estrutura quaternária

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo aos meus pais, Iloídes e Vera, e irmã, Lia, por me guiarem no caminho da honestidade e empatia. Ressalto o imenso suporte ao longo desta trajetória acadêmica; sem vocês este caminho seria impossível. Muito obrigado por tudo! O amor que sinto por vocês é incondicional.

Aos meus amigos, Ariel, Dionatan, José, Francine e Patrícia, pelo companheirismo e pelas palavras, doces e duras; a presença de vocês foi muito importante em momentos de solidão e falta de autoconfiança, sinto que a cada conversa franca um eu mais forte surge.

Ao Professor Osmar Norberto de Souza, pela oportunidade dada a um aluno inexperiente, com o potencial de trazer grandes dores de cabeça. Agradeço a paciência e a sua paixão por ensinar, foram necessárias para que eu conseguisse conduzir este trabalho.

Ao Professor Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers, por aceitar auxiliar um discente inseguro correndo contra o tempo. Sua paciência, disposição e sugestões foram cruciais para o desenrolar desta pesquisa.

Ao Professor Luiz Augusto Basso, por aceitar assumir um discente desconhecido, correndo o risco de ter seu nome em um trabalho mal desenvolvido. Agradeço a oportunidade.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente Flavielle, que foram muito presentes no meu primeiro ano de mestrado, muitas vezes com palavras de conforto ou ensinamentos, que amenizaram uma trajetória acadêmica estressante.

Aos Professores que aceitaram participar da minha banca avaliadora e apontar os caminhos rumo ao aprimoramento do texto final.

À Bruna Caldas Remédio, secretária do PPGBCM, por sua paciência, prestatividade e simpatia ao conseguir resolver meus vários problemas e dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da minha pesquisa.

Por último, agradeço a experiência deste ciclo. Todos os elementos que envolveram este mestrado contribuíram a moldar a autoconfiança de um aluno que, infelizmente, não conseguiu aproveitar a graduação da forma que hoje gostaria. Este período foi essencial para que eu pudesse me provar ser capaz de desempenhar uma função complexa e, nisso, descobrir o valor da determinação e o amor à ciência.

LUCAS SANTOS CHITOLINA

Estudo *in silico*, por dinâmica molecular clássica, da estrutura terciária da enzima MtInhA (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* sob restrições da estrutura quaternária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Coorientador: Prof. Dr. Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers

Porto Alegre

2021

Ficha Catalográfica

C543e Chitolina, Lucas Santos

Estudo in silico, por dinâmica molecular clássica, da estrutura terciária da enzima MtInhA (EC 1.3.1.9) de Mycobacterium tuberculosis sob restrições da estrutura quaternária / Lucas Santos Chitolina. – 2021.

71.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso.

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers.

1. Flexibilidade. 2. Mtb. 3. MtInhA. 4. Homotetrâmero. 5. Subunidades. I. Basso, Luiz Augusto. II. Timmers, Luís Fernando Saraiva Macedo. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

Lucas Santos Chitolina

Estudo *in silico*, por dinâmica molecular clássica, da estrutura terciária da enzima MtInhA (EC 1.3.1.9) de *Mycobacterium tuberculosis* sob restrições da estrutura quaternária

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em 30 de março de 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Prof. Dr. José Fernando Ruggiero Bachega

Prof. Dr. Pablo Machado

Porto Alegre
2021

RESUMO

Flexibilidade e função são propriedades relacionadas no estudo da dinâmica proteica. A flexibilidade reflete no potencial conformacional das proteínas e, deste modo, nas suas funcionalidades. A presença de interações entre complexos proteína-ligante e proteína-proteína, de substratos e alterações ambientais, podem alterar a plasticidade proteica, atuando desde o rearranjo das cadeias laterais de aminoácidos até o desdobramento/dobramento de grandes motivos estruturais. Com o intuito de avaliar os efeitos da flexibilidade em sistemas proteicos, definimos como alvo do nosso trabalho a enzima 2-*trans*-enol-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), ou MtInhA, a qual apresenta-se como um homotetrâmero em solução. Apesar de a sua estrutura quaternária ser a forma biologicamente ativa, estudos computacionais simulam a MtInhA como um monômero, justificando a independência dos sítios ativos devido às suas distâncias, assim como, o custo computacional. Entretanto, já foram descritas diferenças na flexibilidade entre as formas tetramérica e monomérica, as quais impactam no tamanho da cavidade de ligação da enzima. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi construir um modelo de simulação monomérico da MtInhA que apresente as características conformacionais da estrutura quaternária da enzima. Para espelhar a influência das subunidades e obter comportamento similar à proteína na forma nativa, aplicamos diferentes constantes de força na estrutura monomérica, para restringir movimento dos resíduos que compõem a cavidade de ligação do substrato. A partir da comparação entre os sistemas monomérico com restrições, tetramérico e monomérico sem restrições, observamos que as simulações com constantes de força aplicadas apresentam um comportamento similar à proteína nativa. Não obstante, essas semelhanças são mais proeminentes nas alças A e B, as quais são regiões importantes para a modulação da flexibilidade do sítio ativo. Portanto, a partir destes resultados apresentamos um modelo de simulação monomérico da MtInhA, que possui características conformacionais da estrutura biologicamente ativa. Assim, os dados obtidos neste trabalho poderão ser aplicados para a geração de modelos flexíveis mais confiáveis para docagem molecular, e também para a realização de simulações por dinâmica molecular mais longas e com um menor custo computacional.

Palavras-chave: Flexibilidade; Mtb; MtInhA; Homotetrâmero; Subunidades.

ABSTRACT

Flexibility and function are related properties in the study of protein dynamics. Flexibility reflects in the conformational potential of proteins and thus in their functionalities. The presence of interactions between protein-ligands and protein-protein complexes, substrates and environmental changes, can alter protein plasticity, acting from the rearrangement of the side chains of amino acids to the unfolding/folding of large structural motifs. In order to evaluate the effects of flexibility in protein systems, we defined as the target of our work the enzyme *2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase* of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), or MtInhA, which presents as a homotetramer in solution. Although its quaternary structure is the biologically active form, computational studies simulate MtInhA as a monomer, justifying the independence of active sites due to their distances, as well as computational cost. However, differences in flexibility between the tetrameric and monomeric forms have already been described, which impact in the size of the enzyme binding cavity. Thus, the objective of this work was to construct a monomeric simulation model of MtInhA that presents the conformational characteristics of the quaternary structure of the enzyme. To mirror the influence of the subunits and obtain behavior similar to the protein in the native form, we applied different force constants in the monomeric structure, to restrict movement of the residues that composes the substrate binding cavity. From the comparison between monomeric systems with restrictions, tetrameric and monomer without restrictions, we observed that the simulations with force constants applied present a behavior similar to the native protein. Nevertheless, these similarities are more prominent in the A and B loops, which are important regions for modulating the flexibility of the active site. Therefore, from these results we present a monomeric simulation model of MtInhA, which has conformational characteristics of the biologically active structure. Thus, the data obtained in this work can be applied to the generation of more reliable flexible models for molecular production, and also for the performance of simulations by molecular dynamics longer and with a lower computational cost.

Key words: Flexibility; Mtb; MtInhA; Homotetramer; Subunit.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do envelope celular do Mtb.....	17
Figura 2 – Biossíntese do ácido micólico em Mtb.....	19
Figura 3 – Reação de redução catalisada pela enzima MtInhA.....	20
Figura 4 – Forma biologicamente ativa da MtInhA	21
Figura 5 – Sítio ativo da MtInhA.....	22
Figura 6 – Realce nos motivos das alças A, B e alça de ligação ao substrato (SBL), do tetrâmero.....	23
Figura 7 – Comparação entre a cavidade de ligação da MtInhA.....	24
Figura 8 – Destaque no volume de superfície acessível ao solvente.....	26
Figura 9 – Alça de ligação ao substrato (SBL) da proteína MtInhA	27
Figura 10 – Distância entre os sítios de cada monômero	29
Figura 11 – Algoritmo básico de dinâmica molecular.....	32
Figura 12 – Definição da análise estrutural.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional

AcpM – Proteína transportadora malonil-acila

ACP – Proteína Carreadora de Acila (do inglês, *Acyl Carrier Protein*)

AG – Arabinogalactano

AI – Alça Inferior

AM – Alça Mediana

Apo – Apoproteína, proteína livre, não complexada com ligante

AS – Alça Superior

CoA – Coenzima A

DE – β -hidroxiacil desidratase

DIIs – Inibidores Diretos da MtInhA (do inglês, *Direct MtInhA Inhibitors*)

DM – Dinâmica Molecular

FarmInf – Laboratório de FarmInformática

FAbH – β -cetoacil sintase

FAS – Sistema de Síntese de Ácidos Graxos (do inglês, *Fatty Acid Synthase*)

FDP – Função densidade de probabilidade

FEB – Energia livre de ligação

H – Hélice

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HA – Hipótese alternativa

HN – Hipótese nula

INCT-TB – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose

INH – Isoniazida

MtInhA – Enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase

MtInhA – Gene que codifica a enzima MtInhA

Kas – β -cetoacil sintase

KatG – Enzima catalase-peroxidase

katG – Gene que codifica a enzima catalase-peroxidase

LABIO – Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas

LYS – Lisina

MabA – β -cetoacil redutase

MDR-TB – Tuberculose multirresistente

MPI – Interface de transmissão de mensagens

MS – Microssegundos

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

NAD⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma oxidada

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida

ns – Nanossegundos: 1 ns = a 10^{-9} segundos.

OMS – Organização Mundial da Saúde

ps – Picossegundo: 1 ps = 10^{-12} segundos

PDB – Banco de Dados de Proteínas (do inglês, *Protein Data Bank*)

PG – Peptidoglicano

PyMOL – Programa de visualização e modelagem molecular

SBL – Alça de Ligação ao Substrato (do inglês, *Substrate-binding Loop*)

SBP – Cavidade de Ligação ao Substrato (do inglês, *Substrate-binding Pocket*)

TB – Tuberculose

TCL – Triclosano (*Triclosan*)

TDM – Trealose dimicolato não ancorada

TB-RR – Tuberculose resistente à rifampicina

TYR – Tirosina

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem

Å – Ångström, unidade de medida de comprimento

α – Alfa

β – Beta

H⁻ – Hidreto, forma aniônica do átomo de hidrogênio H

kcal – Quilocaloria

n° – Grau angular

SUMÁRIO

Capítulo 1

1	INTRODUÇÃO.....	15
	1.1 Tuberculose e Farmacoterapia.....	15
	1.2 Envelope Celular e Biossíntese de Ácidos Graxos.....	16
	1.3 A Enzima MtInhA.....	19
	<i>1.3.1 Hierarquia estrutural.....</i>	<i>20</i>
	1.4 Interação sítio-ligante.....	24
	1.5 Flexibilidade.....	27
	1.6 Dinâmica Molecular Clássica.....	30
	1.7 Campos de Força e Acessibilidade.....	31
	1.8 Aplicação do Método da Dinâmica Molecular Clássica.....	33
2	OBJETIVOS.....	35
	2.1 Objetivo Geral.....	35
	2.2 Objetivos Específicos.....	35
3	JUSTIFICATIVA.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
	4.1 Protocolo de Aplicação.....	37
	4.2 Análise Estrutural.....	38

Capítulo 2

Artigo científico

Capítulo 3

	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
5	REFERÊNCIAS.....	62

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

Justificativa

Metodologia

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose e Farmacoterapia

Uma das 10 principais causas de morte no mundo, a tuberculose (TB) é uma doença transmissível e agressiva. Cerca de um quarto da população mundial hospeda o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), e, logo, apresenta potencial de desenvolver a enfermidade (WHO, 2019).

Apenas a partir de 1940 foram desenvolvidos medicamentos efetivos ao tratamento da doença. Na década de 70, o protocolo recomendado para casos de TB — suscetíveis a medicamentos — foi constituído de uma quimioterapia de curta duração (6 meses) com rifampicina (R), isoniazida (H) e pirazinamida (Z), conhecido como esquema RHZ. A partir de 2009, no Brasil, foi acrescentado o etambutol (E) ao esquema (RHZE), e implementado o uso de pílulas com dose fixa combinada (DFC). O tratamento apresenta uma primeira fase de 2 meses do esquema RHZE sob forma de DFC, seguido por uma fase de manutenção de 4 meses com esquema RH, sob forma de DFC; a segunda fase pode sofrer modificações de acordo com as condições do paciente (Ruffino, 1999; Hijjar *et al.*, 2007). O tratamento para pessoas com TB resistente à rifampicina (TB-RR) e TB multirresistente (MDR-TB) é mais longo e requer medicamentos que são mais tóxicos e dispendiosos; o custo de tratar um caso de MDR-TB pode chegar de 10 a 15 vezes o custo do tratamento de um caso de tuberculose suscetível a medicamentos (Mckinney, Jaccobs, & Bloom, 1998). Os dados mais recentes relatados à organização mundial da saúde (OMS) mostram uma taxa de sucesso do tratamento para TB-MDR de 56% (WHO, 2019).

A micobactéria apresenta um mecanismo de resistência intrínseca que dificulta a terapêutica da doença. As propriedades características do bacilo incluem: estado de dormência, crescimento lento, envelope celular complexo, patogenicidade intracelular e homogeneidade genética (Wheeler & Ratledge, 1994). A somatória destas adaptações gera uma resposta imune do hospedeiro que pode conter, mas não erradicar, a infecção; resulta em um estado de dormência no qual o bacilo permanece temporariamente inativo em meio intracelular. O tempo de duplicação (meio sintético e/ou animais infectados) do Mtb é de aproximadamente 24 horas. Estas propriedades contribuem para a natureza crônica da doença e dificuldades na recuperação do paciente: o que resulta em regimes de tratamentos longos (Chan & Kaufmann, 1994).

Dentre os fármacos mais utilizadas no tratamento à TB está a Isoniazida (INH), que foi descoberta em 1952, apresentando forte atividade bactericida contra o Mtb (Bersntein, Lott,

Steinberg, & Yale, 1952; Fox, 1952). Foi identificado que o alvo da ação do fármaco era a enzima MtInhA, produto do gene *MtInhA* (Banerjee *et al.*, 1994). A INH, sozinha, não inibe diretamente a proteína, necessita de uma conversão para sua forma ativa, que é realizada pela enzima catalase-peroxidase (KatG), codificada pelo gene *katG*; deste modo, ela é considerada um pró-fármaco (Johnson & Schultz, 1994; Johnson, Schultz & King 1995; Quemard *et al.*, 1996; Schroeder, de Souza, Santos, Blanchard & Basso, 2002). Após conversão, ela se torna covalentemente ligada ao anel de nicotinamida da coenzima da MtInhA — NADH — dentro do sítio ativo da enzima, e, desse modo, inibe a atividade redutase da proteína (Quemard *et al.*, 1996). Todavia, a interação da INH com a coenzima NADH não é específica da MtInhA, fato que torna este mecanismo de ação amplo, podendo causar impacto em outras rotas enzimáticas.

Com o surgimento de uma nova doença, ou mutação do patógeno, há necessidade da busca por fármacos e tratamentos mais eficientes; no caso da progressão de resistência ao fármaco, a receita padrão tem envolvido três condutas principais: modificação de classes de agentes já existentes, interferência com os mecanismos de resistência (para aumentar o acesso ao alvo), e procura por agentes com novas abordagens de ação (Kessler, 1997). Grande parte dos antibióticos introduzidos desde 1960 são modificações farmacofóricas de estruturas já existentes (Bax, 1997). A adaptação de patógenos aos medicamentos induz à análise de interações intermoleculares no complexo receptor-ligante do microorganismo alvo, com o intuito de identificar os elementos que atuam na redução da eficácia medicamentosa; o estudo aprofundado sobre os ciclos metabólicos do patógeno, estrutura de proteínas (estabilidade, flexibilidade e função) e produtos envolvidos nestes ciclos, acrescenta informações para o aprimoramento terapêutico (Glickman, Cahill, & Jacobs, 2001).

1.2 Envelope Celular e Biossíntese de Ácidos Graxos

O *Mtb* é frequentemente estudado por apresentar uma composição estrutural atípica, uma micomembrana. Seu envelope celular tem diversidade de componentes em regiões superiores e inferiores, e apresenta um complexo chamado mAGP (Jankute, Cox, Harrison & Besra, 2015; Alderwick, Harrison, Lloyd & Birch, 2015), que é constituído por uma camada de peptidoglicano (PG) conectada à camada de arabinogalactanos (AG), e esta ligada a uma camada de ácidos micólicos, constituindo a micomembrana (Brennan & Nikaido, 1995, Fu & Fu-Liu, 2002) (**Figura 1**); a vantagem deste complexo é uma grossa camada lipídica externa que protege o organismo de ataques químicos e do sistema imune do hospedeiro, sendo essencial para a viabilidade da célula. As razões para a adaptação desta membrana não estão completamente claras, todavia sabe-se que esta composição tem relevância na virulência e resis

tência intrínseca a antibióticos do Mtb (Forrellad *et al.*, 2013; Becker & Sander, 2016). Ácidos micólicos são majoritários nesta barreira natural (C. Asselineau & J. Asselineau, 1978; Barry *et al.* 1998; Lederer, Adam, Ciorbaru, Petit, & Wietzerbin, 1975; Minnikin, 1982), seus anéis de ciclopropano contribuem para a integridade da parede (George, Yuan, Sherman & Barry, 1995), e protegem contra a ação oxidativa de compostos como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Yuan, Lee, Besra, Belisle, & Barry, 1995).

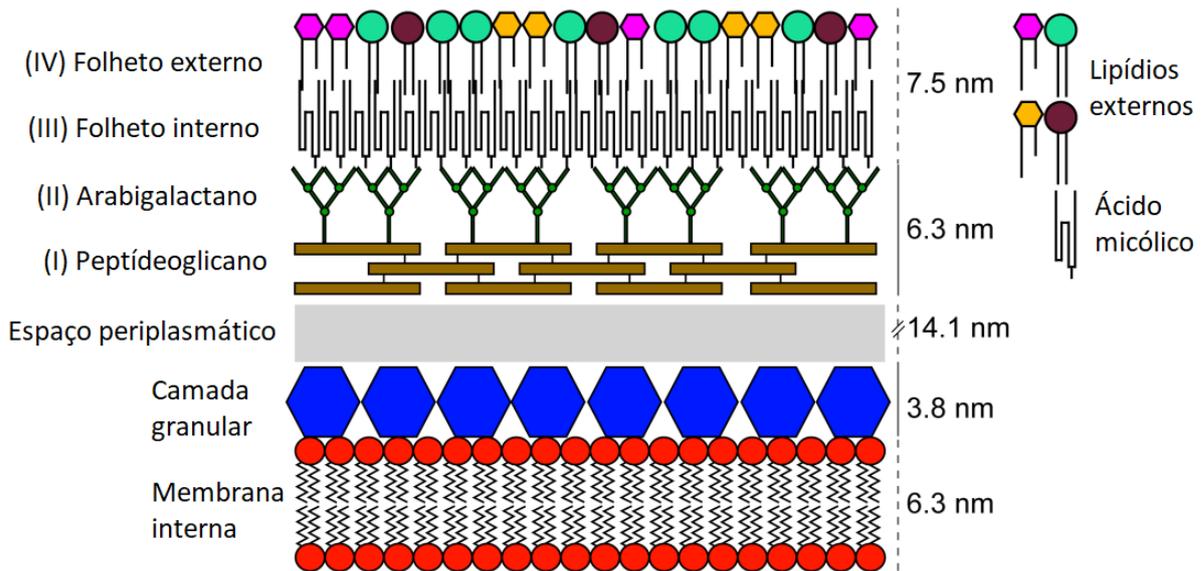


Figura 1. Estrutura do envelope celular do *Mycobacterium tuberculosis*. Escala dos componentes em nanômetros.

Fonte: De “Vincent, A. T., Nyongesa, S., Morneau, I., Reed, M. B., Tocheva, E. I., & Veyrier, F. J. (2018). The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict from the Past or the Result of Recent Evolution? *Frontiers in microbiology*, 9, 2341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02341>

Poucos organismos apresentam essa grande diversidade de moléculas lipofílicas como o Mtb. A diversidade se estende de ácidos graxos simples, como o palmitato, tuberculostearato, isoprenoides, até grandes e complexas cadeias, como os ácidos micólicos (Riley & Labeledan, 1996). Componentes vitais da parede celular, os ácidos micólicos são alvos-chave para muitos fármacos antituberculose de primeira linha como INH e Etionamida (Marrakchi, Lanéelle & Daffé, 2014; Kruh, Rawat, Ruzsicska & Tonge, 2007). Estes compostos são constituídos por uma série homóloga de ácidos graxos α -alquil β -hidroxil (C₆₀-C₉₀) produzidos por todas as micobactérias; e existem em duas formas principais: (1) primariamente como ácidos micólicos ancorados (ésteres do terminal arabinogalactano) (Brennan & Nikaido, 1995, Jankute *et al.*, 2015); (2) como trealose dimicolato não ancorada (TDM), lipídios livres dentro da parede celular. TDM é o mais abundante, granulomagênico e significativamente tóxico lipídio extraível da superfície celular do Mtb virulento (Hunter, Olsen, Jagannath & Actor, 2006). Como já comentado, os ácidos micólicos são responsáveis por garantir propriedades importantes ao pa-

tógeno, fato que torna as enzimas envolvidas em sua biossíntese essenciais para a sobrevivência da micobactéria e, logo, representam ótimos alvos terapêuticos. Dentre estas características, o trabalho de Bhat *et al.*, 2007 resalta um grande conjunto: resistência à desidratação, resistência à danos químicos, baixa permeabilidade a antibióticos hidrofóbicos, virulência (Dubnau *et al.*, 2000; Glickman, Cox & Jacobs, 2000; Glickman, Cahill & Jacobs, 2001), formação de biofilme (Ojha *et al.*, 2005) e capacidade de persistência no hospedeiro (Yuan *et al.*, 1998; Glickman *et al.*, 2000; Bhatt, Molle, Besra, Jacobs & Kremer, 2007).

O processo de alongamento de ácidos graxos, conhecido como FAS (“Fatty Acid Synthase”) envolve ciclos de **condensação** — β -cetoacil sintases (FabH, KasA e B); **β -ceto redução** — β -cetoacil redutases (MabA); **desidratação** — β -hidroxiacil desidratases (DE); e **enoil-redução** — 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase, MtInhA (Heath, White & Rock, 2001, Quemard *et al.* 95). Esta via metabólica é dividida em dois sistemas: FAS I, sistema eucariótico, e FAS II, procariótico. FAS I catalisa a síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA, de C₁₆ a C₁₈, e alonga-os para produtos de C₂₄ a C₂₆ (Zimhony, Vilchêze & Jacobs, 2004). A partir disto, estas acil-CoAs de cadeia média servem de precursores para o sistema FAS II, que não é capaz de realizar a síntese *de novo*, mas alonga os intermediários acil-ACP para ácidos graxos entre C₂₄ a C₅₆, por meio de quatro enzimas dissociáveis que agem sucessiva e repetitivamente para alongar a cadeia acil (Bhatt *et al.*, 2007). A primeira etapa de condensação de acil-CoA ocorre pela ação da β -cetoacil-AcpM sintase III (FabH) com a proteína transportadora malonil-acila (AcpM) (Scarsdale, Kazanina, He, Reynolds & Wright, 2001; Brown *et al.*, 2005). O alongamento conseguinte requer a ação da redutase β -cetoacil-ACP-NADH-dependente (MabA), resultando na formação de β -hidroxiacil-AcpM. O terceiro e quarto estágios envolvem a desidratação, por β -hidroxiacil-AcpM desidratases, e enoil-redução pela enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase, MtInhA, respectivamente (Quemard 1995) (**Figura 2**). Por fim, as etapas sucessivas de condensação são realizadas pelas β -cetoacil-AcpM sintases (KasA e KasB, no lugar da FabH), e resultam na longa cadeia meromicolil-AcpMs (até C₅₆), que são os precursores diretos do ácido micólico maduro (Bhatt, Kremer, Dai, Sacchettini, & Jacobs, 2005; Bhatt *et al.*, 2007).

Como visto, uma etapa enzimática chave nesta via é a realizada pela MtInhA, enzima pertencente a uma família de redutases de cadeia curta (Quemard *et al.*, 1995; Dessen *et al.*, 95). A inativação genética da proteína resulta no acúmulo de ácido hexacosanóico (C₂₆) da via FAS I, resultado similar ao observado em células tratadas com INH, causando a morte celular da micobactéria (Vilcheze *et al.*, 2000). Dado o aumento da TB-MDR, é necessário o estudo da complexidade estrutural e funcional de proteínas atuantes em ciclos metabólicos do bacilo;

neste âmbito, as estruturas tridimensionais destas proteínas, disponíveis em bancos de dados, são uma importante ferramenta de auxílio (Marrakchi, Zhang, & Rock, 2002). Com o apoio de aplicações computacionais sobre estas estruturas, é possível analisar o papel desempenhado por todos os potenciais contatos moleculares entre resíduos, substratos, cofatores e inibidores, e, logo, acrescentar informações importantes à projeção de inibidores mais potentes (Shaw *et al.*, 2017).

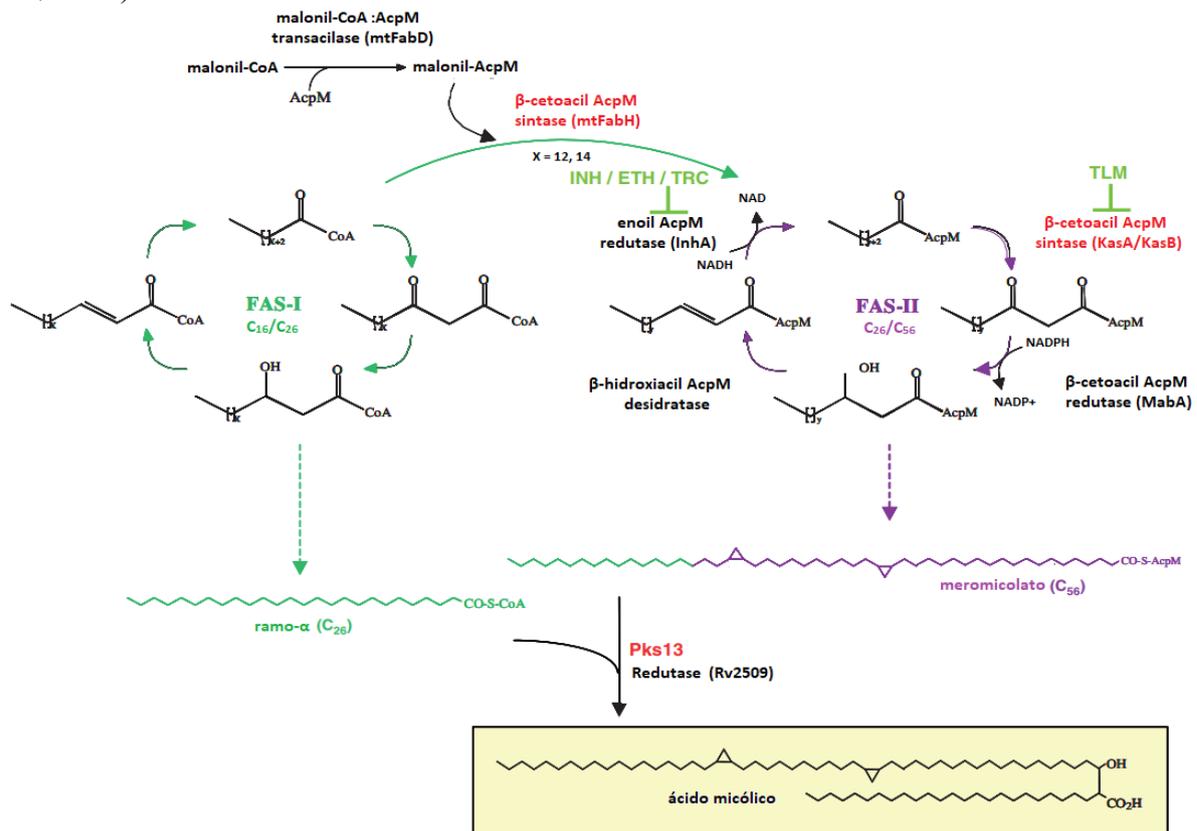


Figura 2. Biossíntese do ácido micólico em *Mtb*. FAS-I está envolvido na síntese de C16 e C26. O produto C16 acil-CoA atua como substrato para a síntese de ácidos meromicólicos por FAS-II, enquanto o ácido graxo C26 constitui o ramo a do ácido micólico final. *MtFabH* foi proposto para ser o elo entre FAS-I e FAS-II, convertendo C14-CoA gerado por FAS-I em C16-AcpM, que é canalizado para o ciclo FAS-II. Este último compreende quatro enzimas que irão atuar sucessiva e repetidamente para garantir o alongamento do ácido graxo, em última análise, levando a meromicolatos (C56). Alvos para a ação da isoniazida ativada (INH), etionamida (ETH), triclosan (TRC) ou tiolactomicina (TLM) estão indicados em verde.

Fonte: De “The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development” de Bhat *et al.*, 2007, *Molecular microbiology*, 64(6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05761.x>

1.3 A Enzima *MtInhA*

A enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (*MtInhA*, EC: 1.3.1.9) é um dos alvos para o tratamento da *Mtb* (Takayama, Wang & Besra, 2005). Ela pertence à família de proteínas desidrogenases/redutases de cadeia curta, a qual utiliza NADH (β-nicotinamida adenina

dinucleotídeo) como cofator; t especificidade por substratos de cadeia longa (C₁₄₋₂₄) e é ativa no sistema FAS II. O substrato (ácido graxo) e a coenzima (NADH) interagem com a MtInhA por meio da conversão de 2-*trans*-enoil-ACP para acil-ACP por meio da transferência de um hidreto (H⁻) do NADH para a posição C3 do substrato 2-*trans*-enoil-ACP, resultando na redução da ligação dupla α tio éster (entre C2 e C3) da porção lipídica do substrato (**Figura 3**) (Quemard *et al.*, 1995, Chollet *et al.*, 2018).

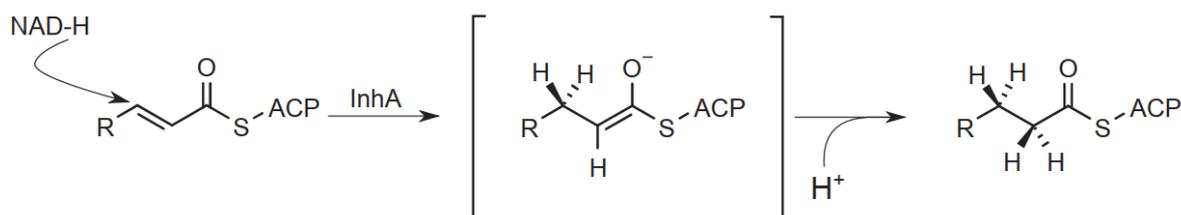


Figura 3. Representação esquemática da reação de redução catalisada pela enzima MtInhA. Fonte: De “An overview on crystal structures of MtInhA protein: Apo-form, in complex with its natural ligands and inhibitors” de Chollet *et al.*, 2018, *European journal of medicinal chemistry*, 146, 318–343. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.047>

Codificada pelo gene *MtInhA*, a enzima MtInhA possui 269 resíduos de aminoácidos em cada subunidade (Parikh, Xiao & Tonge, 2000). Por meio de análises por cromatografia de exclusão de tamanho, descobriu-se que a enzima é um homotetrâmero, conjuntos de quatro subunidades iguais, em solução (**Figura 4**), e esta é a sua forma biologicamente ativa (Quemard *et al.*, 1995).

1.3.1 Hierarquia Estrutural

Cada subunidade apresenta dois sítios de ligação, um para a ligação da coenzima NAD (H) ou NADP (H) e outro para a associação do ácido graxo (Dessen *et al.*, 1995). A estrutura monomérica é composta por sete fitas β (S1 a S7) e oito hélices α (H1 a H8), as quais formam duas dobras de Rossmann fold (S1/SH1/S2/H2/S3 e S5/H5/S6/H8/S7); hélices α e fitas β podem ser encontradas acima do sítio de ligação da coenzima, criando uma fenda à qual se liga o substrato (Sacchettini & Blanchard., 1996). A estrutura da subunidade apresenta formato análogo a uma cadeira: a coenzima se liga a uma cavidade entre o “encosto” e o “assento” da estrutura, e o sítio de ligação do substrato é encontrado em uma cavidade no “encosto” (Dessen *et al.*, 1995).

Dois hélices α transversais sustentadas por alças constituem o lado mais externo da fenda de ligação do substrato, este conjunto de resíduos (P192, I193, R194, T195, L196, A197, M198, S199, A200, I201, V202, G203, G204, A205, L206, G207, E208, E209, A210, G211, A212, Q213, I214, Q215, L216, L217, E218, E219, G220, W221, D222, Q223, R224, A225, P226, I227,

G228, W229, N230, M231, K232, D233) é conhecido como “alça de ligação ao substrato” (SBL) Dessen *et al.*, 1995). Os resíduos de aminoácidos situados do lado oposto à SBL também formam duas alças, que conectam hélices α e fitas β , importantes para a ligação do substrato no sítio ativo, alça A (F96, M97, P98, Q99, T100, G101, M102, G103, I104, N105, P106, F107, F108, D109, A110, P111, Y112, A113, D114, V115, S116, K117, G118, I119, H120), e alça B (D149, P150, S151, R152, A153, M154, P155, A156, Y157, N158, W159, M160, T161, V162, A163, K164, S165, A166). Juntos, a SBL e as alças A e B compõem a cavidade de ligação do substrato (SBP) (**Figura 5**). As alças A e B são vistas no lado interno da MtInhA, em contato com as outras subunidades do tetrâmero, enquanto o primeiro conjunto (SBL) está voltado para o solvente, para fora do tetrâmero, à esquerda do substrato (**Figura 6**).

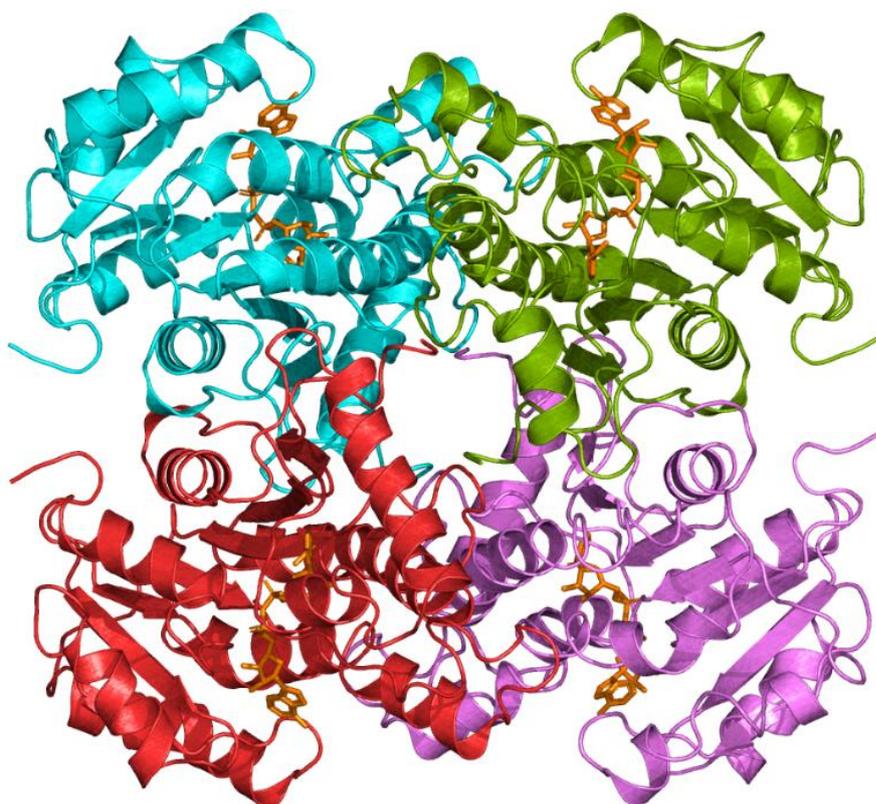


Figura 4. Forma biologicamente ativa da MtInhA (Código PDB: 1BVR); unidade funcional (homotetrâmero). Representação (*cartoon*) da cadeia principal das subunidades C (ciano), D (verde), E (violeta) e F (vermelho). Imagem gerada com o programa PyMOL versão 2.3.2 (Schrödinger, LLC, 2010).

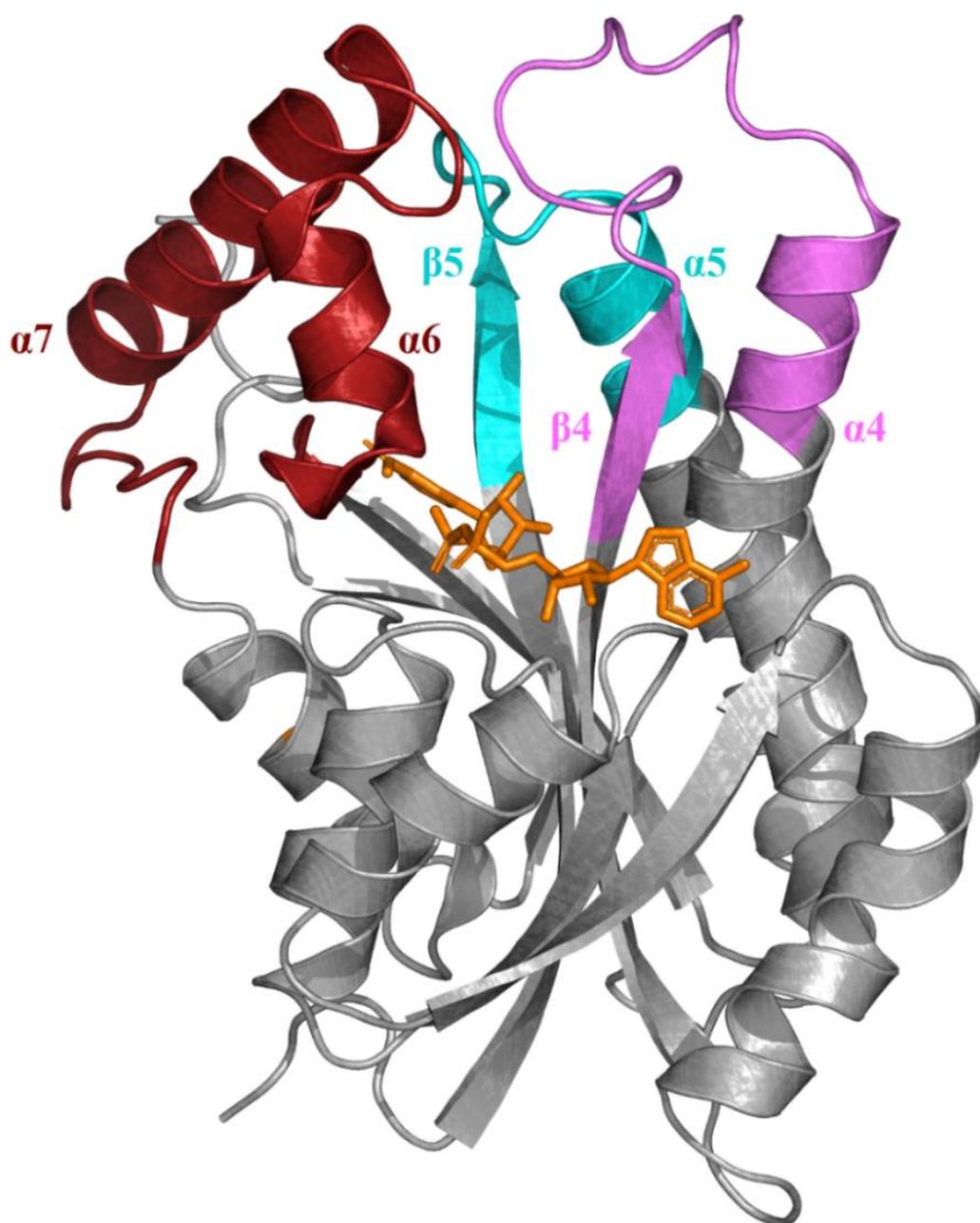


Figura 5. Sítio ativo da MtInhA (*cartoon*) (PDB ID: 1ENY). Em destaque as estruturas que compõem o sítio: os motivos A (rosa) e B (ciano) e o motivo estrutural da alça de ligação ao substrato (vermelho). A coenzima NADH está representada por modelo em *stick* (laranja). Imagem gerada pelo programa PyMOL versão 2.3.2 (Schrödinger, LLC, 2010).

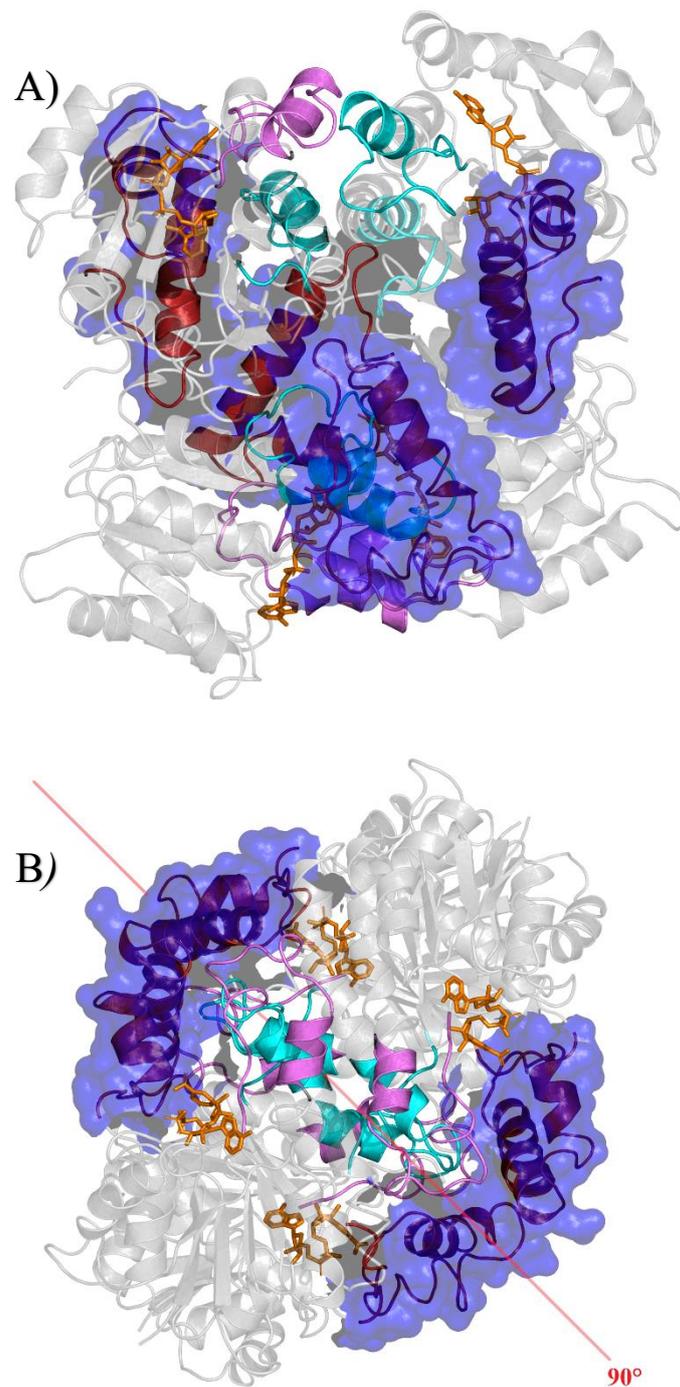


Figura 6. Tetrâmero da MtInhA (*cartoon*) (PDB ID: 1BVR); realce sobre as alças A (rosa) e B (ciano) voltadas para o lado interno, em contato com porções das alças A e B da subunidade adjacente; motivo estrutural da alça de ligação ao substrato (magenta) com superfície azul em contato com o solvente. Coenzima em *sticks* (laranja). **(A)** Vista padrão do homotetrâmero. **(B)** Mudança de 90° no eixo vertical em relação à Figura A, visualização do “topo”. Imagem gerada pelo programa PyMOL versão 2.3.2 (Schrödinger, LLC, 2010).

O sítio ativo da MtInhA aporta variados tamanhos de substratos (volume da cavidade plástica), reflexo da flexibilidade da SBL e, como um todo, da proteína. Ao compararmos diferentes estruturas cristalográficas da enzima (associadas a ligantes distintos, coenzima NADH/NAD, ou em forma Apo), podemos perceber diferenças no grau de plasticidade da SBL. Na **Figura 7** é evidenciada a diferença de conformação entre a SBL, em dois modelos estruturais da MtInhA (PDB ID: 1ENY e 3FNH), e também a rotação em 60° da cadeia lateral do resíduo TYR 158 (alça A) — resíduo essencial para a estabilização do substrato na SBP — (Rozwarski *et al.*, 1999).

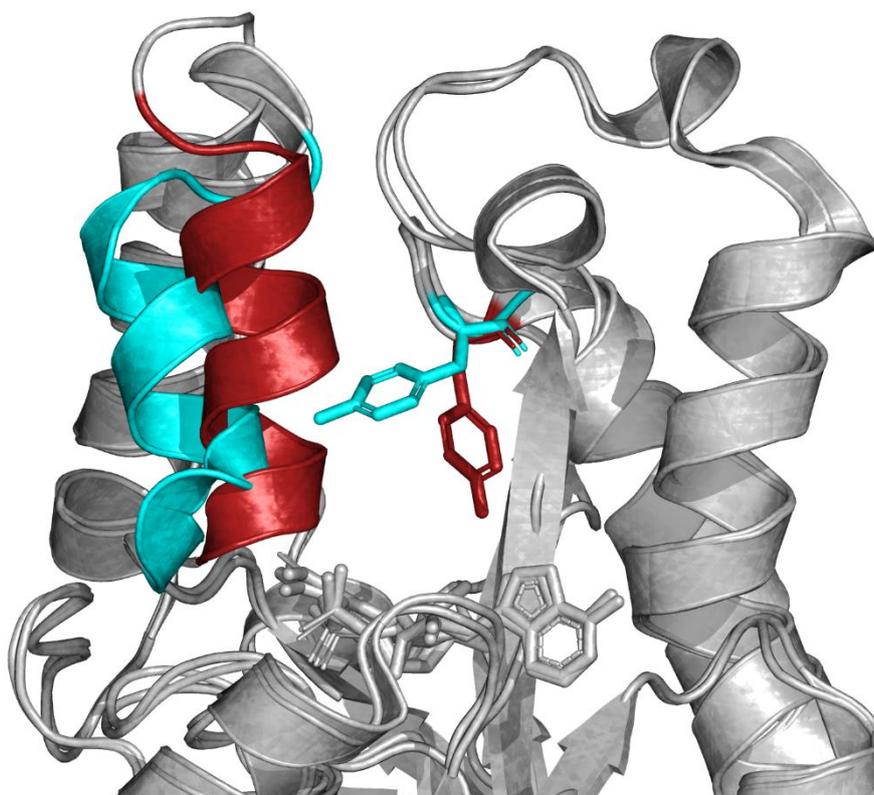


Figura 7. Comparação entre a cavidade de ligação da MtInhA (*cartoon*). Destaque na flexibilidade da SBL e disposição angular do resíduo TYR 158, ao alinharmos duas estruturas cristalográficas diferentes (Código PDB: 1ENY e 3FNH, ciano e vermelho, respectivamente). Imagem gerada com PyMOL versão 2.3.2 (Schrödinger, LLC, 2010).

1.4 Interação sítio-ligante

Diferentes fatores podem influenciar no grau de efetividade da interação entre enzima e ligante; dentre esses, áreas caracterizadas por maior hidrofobicidade média, maior carga total e, mais flexíveis, são alvos de estudo (Lai *et al.*, 2015). Análises considerando o fator de vibração térmica das moléculas (fator-B), podem auxiliar na identificação de regiões flexíveis em diferentes regiões da enzima. Com isso, simulações biomoleculares são importantes ferramentas para identificar propriedades que podem servir como guia na definição de regiões que precisam de uma análise detalhada e que indiquem maior flexibilidade, como a SBP.

Um estado de conformação “fechado” da SBL é reflexo de uma interação mais intensa entre resíduos e ligantes dentro do sítio ativo da MtInhA (Qiu *et al.*, 1999). Kumar & Shobia (2013) realizaram a comparação entre dois estados (aberto e fechado) da SBL, pela análise de diferentes conformações presentes nas estruturas cristalográficas depositadas no PDB. Foi demonstrado que em estruturas como: 1P44 e 1BVR, a SBL apresenta conformação aberta (**Figura 8A**); já em outras estruturas cristalográficas, como de complexos ternários (3FNH, 2NSD, 2H7M) e de um complexo binário (2IDZ), foi identificada propriedade conformacional fechada da SBL (**Figura 8B**) (Kumar & Sobhia, 2013). E ainda mudanças conformacionais na hélice $\alpha 6$ foram descritas de acordo com a intensidade de interação dentro do sítio; interações fracas entre receptor e ligantes apresentam duas voltas na hélice $\alpha 6$ e conformação aberta da SBL, já complexos com interações fortes demonstraram conformação fechada e três voltas bem definidas na hélice $\alpha 6$ (Kumar & Sobhia, 2014). A plasticidade dos motivos que compõem a SBP reflete em um volume amplo da cavidade (499.138 Å³ a 978.779 Å³, 2FNH e 1P44, respectivamente), e no potencial de interações dentro deste sítio.

Alguns resíduos, como TYR158 e LYS165, são essenciais para a redução trans-enoil e para a remoção do próton do anel nicotinâmico. O grupo hidroxila da TYR 158 doa um próton para o oxigênio da carbonila (C1) do substrato, resultando em um ânion enolato (Parikh *et al.*, 2000). A interação deste resíduo com o ácido graxo é um comportamento presente e essencial compartilhado entre todas as enoil ACP redutases (Sullivan *et al.*, 2006).

Interações hidrofóbicas participam das conexões padrão com inibidores; a SBP apresenta proporção de 69,82% resíduos hidrofóbicos (G96, F97, M98, P99, G102, M103, G104, I105, P107, F149, P151, A154, M155, P156, A157, W160, M161, G192, P193, I194, L197, A198, M199, A201, I202, V203, G204, G205, A206, L207, G208, A211, G212, A213, I215, L217 e L218); os 30,18% restantes são hidrofílicos (Q100, N106, T101, D150, S152, R153, Y158, N159, R195, T196, S200, E209, E210, Q214, Q216 e E219). Dos resíduos hidrofóbicos, a maioria está localizada na alça de ligação ao substrato (A198, M199, A201, I202, L207, I215, L218) (Sullivan *et al.*, 2006). A SBL, que compõe a maior alça na estrutura da enzima, pode ser dividida em três partes: alça superior (AS, resíduos: 204-208), alça mediana (AM, resíduos: 197-203) e alça inferior (AI, resíduos: 194-196) (**Figura 9**). No momento em que a AS interage com a alça B, ela cobre o sítio a partir do topo fazendo interações entre alças. Ao analisarmos distintas estruturas cristalográficas da MtInhA, é possível perceber a variedade conformacional no complexo ligante e SBL (Kumar & Shobia, 2013).

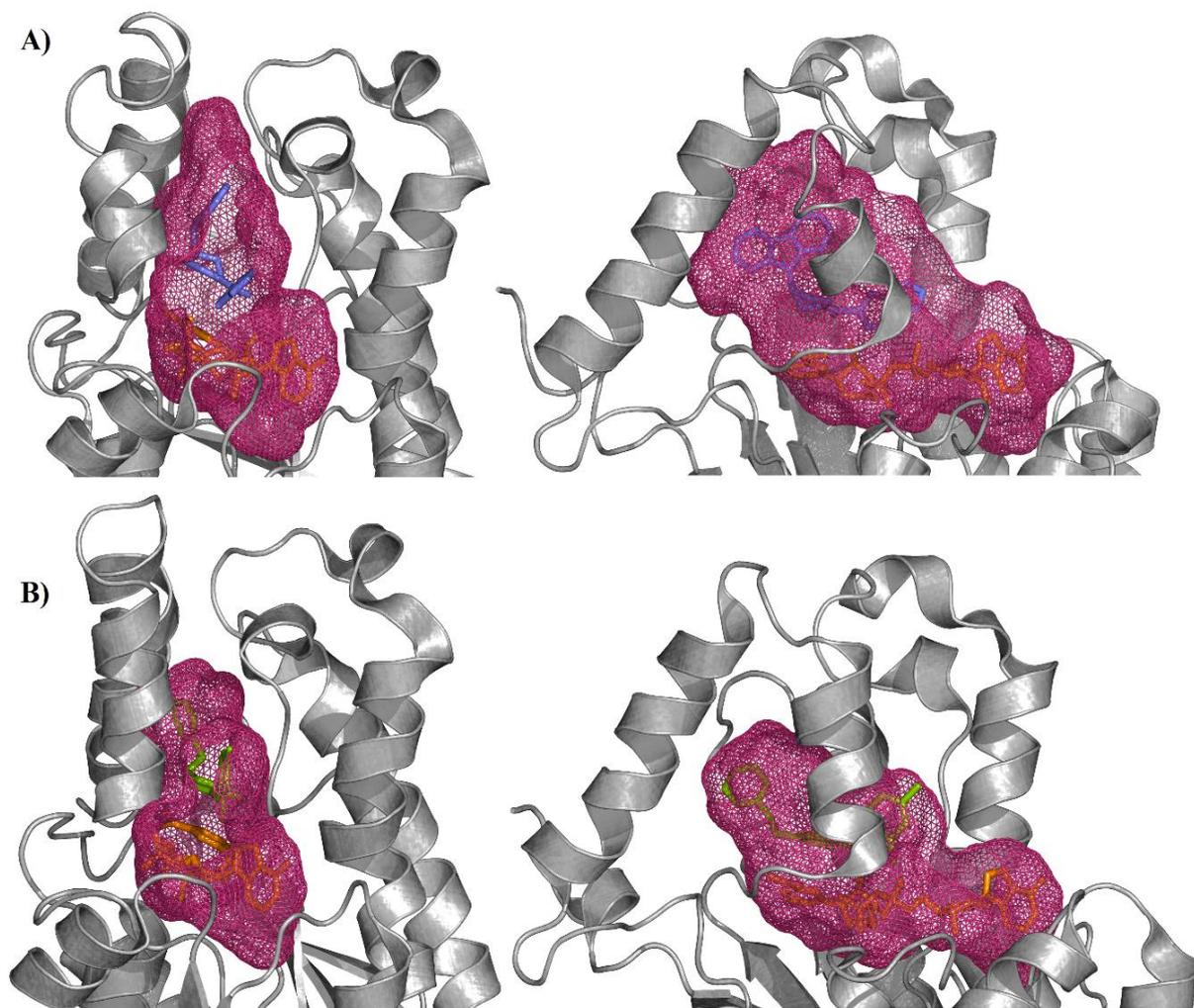


Figura 8. Destaque no volume de superfície acessível ao solvente (SA) (roxo) em estrutura com conformação aberta e estrutura com conformação fechada, respectivamente. **(A)** Estrutura com “conformação aberta”, complexada com NAD⁺ e substrato de ácido graxo C16 (não representados), apresenta SA com valor de 849.010 Å³ (Código PDB: 1P44 cadeia D). **(B)** Estrutura com “conformação fechada”, complexada com NAD⁺ e triclosano (não representados), apresenta SA com valor de 499.138 Å³ (PDB: 3FNH). Representação (*cartoon*). Imagem gerada com PyMOL (Schrödinger, LLC, 2010).

A alça de ligação ao substrato apresenta conformação “fechada” ou “aberta”, resíduos das alças A e B são importantes na interação receptor-ligante; estas propriedades atuam nos diferentes níveis de flexibilidade e afinidade a ligantes (Qiu et al., 1999). Visto que proteína e ligante apresentam flexibilidade e graus de afinidade a partir de determinadas variantes, ambos ajustam suas conformações em razão de alcançar o encaixe ótimo entre enzima e ligante (E. M. Cohen, Machado, M. Cohen, & Norberto de Souza, O, 2011). Definir a diferença entre as classificações de disposição da SBL, identificar propriedades como o fator-B e analisar resíduos importantes nontes no sítio ativo são diretrizes no estudo da dinâmica da MtInhA (Kumar & Sobhia, 2014; Tarabini, Timmers, Sequeiros-Borja, & Norberto de Souza, 2019).

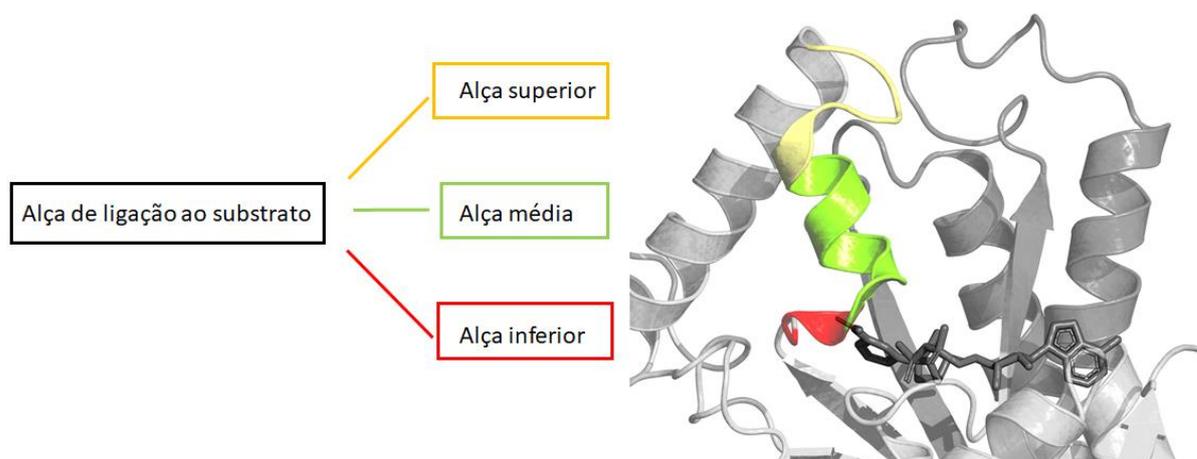


Figura 9. Alça de ligação ao substrato (SBL) da proteína MtInhA (Código PDB: 1ENY). Os três segmentos constituintes da SBL estão identificados nas seguintes cores: AS em amarelo, AM em verde e AL em vermelho. Imagem gerada pelo programa PyMOL versão 2.3.2 (Schrödinger, LLC, 2010).

1.5 Flexibilidade

Flexibilidade e função são sinônimos no estudo da dinâmica proteica. As proteínas têm capacidade de sofrer transições conformacionais funcionalmente relevantes, sob condições de estado nativo, em uma vasta gama de escalas de tempo e espaço (Tsai, Kumar, Ma, & Nussinov, 1999; Bahar, Chennubhotla, & Tobi, 2007; Henzler-Wildman & Kern, 2007). A flexibilidade reflete em potencial conformacional, e conseqüente funcionalidade; essa propriedade é importante ao reconhecimento biomolecular (Feixas, Lindert, Sinko, & McCammon, 2014). A presença de ligantes, substratos, mudanças no ambiente (pH, íons, temperatura) pode alterar o nível de plasticidade da proteína atuando desde a variação no rearranjo de cadeias laterais de aminoácidos, até no desdobramento/dobramento de grandes motivos estruturais (Teilum, Olsen, & Kragelund, 2011).

A maioria dos trabalhos em desenvolvimento de fármacos baseados em estrutura utilizam uma única e rígida estrutura do receptor; do contrário, o espaço conformacional a ser considerado tornar-se-ia muito grande, pois exige uma demanda computacional alta e demorada (Erickson, Jalaie, Robertson, Lewis, & Vieth 2004). Contudo, de acordo com Totrov & Abagyan (2008), os melhores algoritmos de docagem molecular predizem erroneamente a posição de ligação de um inibidor em aproximadamente 50 a 70% quando apenas um modelo de receptor rígido é considerado (Totrov & Abagyan, 2008, Cohen *et al.*, 2010).

Há muitos resultados de sucesso na modelagem e desenvolvimento computacional de fármacos que foram alcançados sem considerar a flexibilidade da proteína, e isso pode ser explicado pelo trabalho ter sido aplicado em enzimas que apresentavam pequenas variações

alostéricas. Ao utilizarmos a flexibilidade como critério, podemos classificar as proteínas em três classes: (i) proteínas “rígidas”, nas quais mudanças induzidas por ligantes resultam em pequenos rearranjos na cadeia lateral, (ii) proteínas “flexíveis”, onde há grandes movimentos em torno de regiões importantes para a atividade enzimática ou em alças de sítios, resultantes da indução por ligantes, e (iii) proteínas “instáveis”, cuja conformação só é definida após a interação com ligante (Cozzini *et al.*, 2008).

A alosteria reflete a função proteica, e a capacidade de medir e simular sua dinâmica é uma questão central no desenvolvimento de compostos bioativos; esta técnica precisa prever com eficiência a conformação que o receptor adotará em resposta ao vínculo de um ligante, ou determinar como projetar tal ligante para um conjunto de conformações (Cozzini *et al.*, 2008). O reconhecimento do ligante pelo receptor é um evento dinâmico onde ambos mudam suas conformações visando minimizar a energia livre de ligação (FEB) nessa associação (Carlson & McCammon, 2000). De modo a se produzir dados que reflitam com maior autenticidade a proteína *in vitro*, é importante tratar tanto receptor quanto ligante como estruturas flexíveis e dinâmicas, apesar desta tarefa exigir maior complexidade, pois considera um conjunto maior de propriedades.

Simulações por dinâmica molecular (DM) utilizando a MtInhA como receptor demonstraram que a associação de ligantes na cavidade de ligação do substrato pode modular diretamente a flexibilidade da SBL, alça A e alça B (da Costa, Pauli, Dorn, Schroeder, Zhan, & de Souza, 2012; Punkvang *et al.*, 2010, Cohen *et al.*, 2011, Kumar & Sobhia, 2016). Estudos anteriores, como de Schroeder *et al.*, 2005, trabalharam com a plasticidade da SBL utilizando apenas uma subunidade da MtInhA, e apesar da importância da informação obtida, o impacto da estrutura inteira não foi considerado, pois os dados vieram a partir de um modelo estrutural terciário, e não quaternário com as quatro subunidades em interação. A escolha de um modelo monomérico representando um tetramérico, no caso da MtInhA, costuma ser justificada em razão dos sítios ativos da estrutura quaternária se localizarem a uma distância de aproximadamente 40 Å entre si (Schroeder *et al.*, 2005, Pauli *et al.*, 2013) (**Figura 10**), e esta propriedade pode sugerir que as subunidades são independentes uma da outra. Todavia, de acordo com a organização quaternária, dois motivos estruturais que compõem o sítio ativo da proteína, alças A e B, estão em contato com os mesmos motivos da subunidade adjacente (Tarabini *et al.*, 2019), como indicado na **Figura 4**, e esta relação entre interfaces usualmente não é considerada em experimentos no modelo monomérico.

Ferramentas como a DM e docagem molecular são subdisciplinas do desenvolvimento computacional de fármacos, que se complementam e podem preencher lacunas necessárias para o entendimento do funcionamento de biomoléculas. Ao direcionarmos o estudo à MtInhA, no constraste entre estrutura monômérica e tetramérica, o primeiro sistema apresenta espaços conformacionais que não são acessíveis ao sistema tetramérico, em razão do seu contato com as outras subunidades e consequente restrição da liberdade de movimento nestas estruturas; isso evidencia que os dois sistemas têm valores distintos em suas conformações padrões e no nível de sua plasticidade. A partir disso surge a questão que motiva este trabalho: o impacto de propriedades da estrutura quaternária na flexibilidade da estrutura terciária em experimentos computacionais. Assim, realizou-se simulações por dinâmica molecular clássica (DMC) sobre sistemas monoméricos com restrição de movimento nos motivos estruturais das alças A e B da

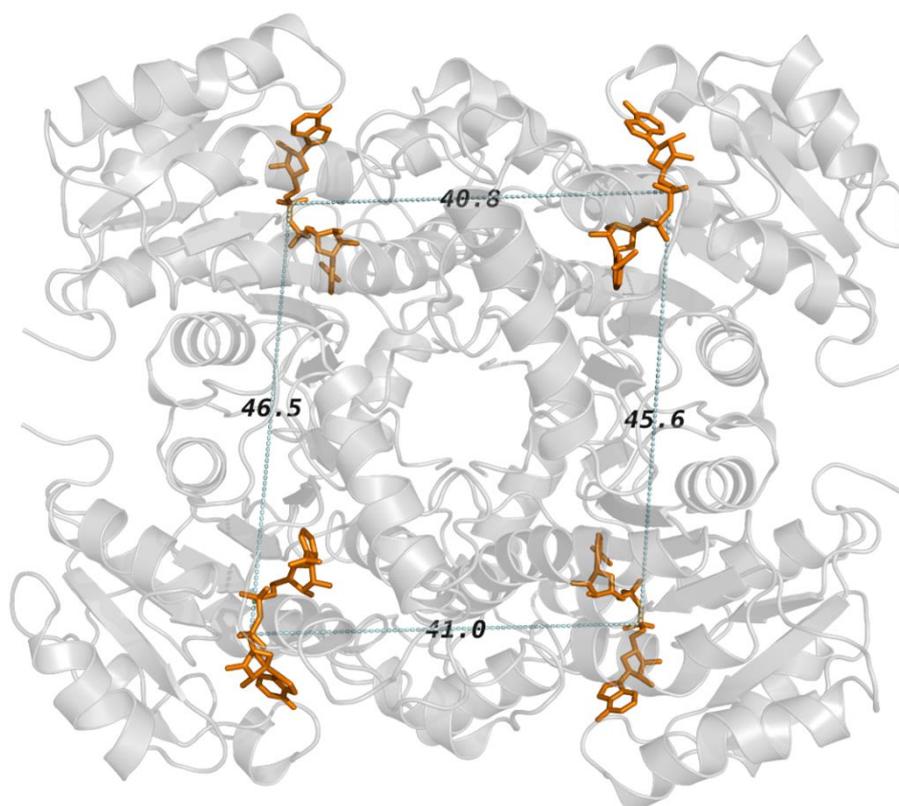


Figura 10. Tetrâmero da MtInhA (PDB ID: 1BVR). Distância entre os sítios ativos presentes em cada monômero da MtInhA.

MtInhA.

1.6 Dinâmica Molecular Clássica

Estruturas tridimensionais (3D) de proteínas têm sido importantes para o entender o funcionamento de macromoléculas *in vitro/in vivo*, e são o pilar para o desenvolvimento de fármacos baseadas em estruturas. No entanto, apesar de sua grande importância, modelos armazenados em bancos de dados, como o PDB, nos dão apenas uma visão parcial da estrutura 3D. Tanto as proteínas quanto os ácidos nucleicos são complexos flexíveis e, assim, requerem ferramentas que consigam analisar a dinâmica de suas funções (Hospital, Goñi, Orozco, & Gelpí, 2015).

A função biológica é baseada em interações moleculares, e estas são resultados de formações macromoleculares. Conhecer a estrutura alvo a nível atômico proporciona uma visão consistente sobre o funcionamento do seu objeto de pesquisa. Os átomos de uma biomolécula estão em constante movimento; em adição, a função molecular e as interações intermoleculares dependem da dinâmica das moléculas envolvidas (ex: inibidor e enzima). O estudo sobre uma dada proteína é escasso ao se basear apenas em um modelo estático, ele precisa analisar a reação biomolecular frente a diversos parâmetros, como interação entre as estruturas, tempo, temperatura, pressão, pH, entre outros; neste caminho, por meio de simulações computacionais, é possível perturbar o complexo a nível atômico, de modo a alcançar uma representação que se assemelhe à proteína biologicamente ativa (Hollingsworth & Dror, 2018).

Pelo método de simulação por DM, baseado em fórmulas físicas que governam as interações interatômicas, é possível prever o comportamento de um átomo em um complexo estrutural no decorrer de um tempo estabelecido (Karplus & Petsko, 1990). Estas simulações podem reproduzir uma grande variedade de processos biológicos, como mudanças conformacionais, interação ligante-receptor, enovelamento proteico, fosforilação, protonação e, ao longo destes processos, prever a posição de todos os átomos à resolução temporal de femtosegundos. É possível calcular a posição espacial e velocidade de cada átomo em função do tempo mediante o auxílio de leis de movimento de Newton; o resultado disto é um filme tridimensional de trajetória atômica da estrutura em questão, que descreve a configuração do sistema (difusão, enovelamento, distribuição de moléculas de solvente ao redor de um soluto, entre outros) em cada ponto durante o intervalo de tempo determinado (Hollingsworth & Dror, 2018).

Dentro da definição de DM há ramificações, que se agrupam conforme a proposta e considerações em cima das interações interatômicas. Dentre esses grupos, podemos citar: Dinâ-

mica Molecular Ab Initio; Dinâmica Molecular Clássica; Dinâmica Molecular Híbrida, Quântico-Clássica, e Dinâmica Molecular Coarse-Grained. Na metodologia das nossas simulações, a DMC é utilizada. Em comparação aos outros métodos de DM, a DMC requer menos tempo de simulação. Isto permite a modelagem de sistemas com tamanho e tempo maiores; esse resultado é possível a custo de ignorar o movimento de elétrons e os incorporar ao núcleo, empregando cargas parciais (Alder & Wainwright, 1959).

A aplicação da DM tem ampla diversidade na testagem de parâmetros e na produção de dados. Como já descrito, a técnica acompanha a posição e movimento de todo e qualquer átomo em um intervalo de tempo. Há grande flexibilidade no ajuste de parâmetros, ou seja, podemos controlar condições nas simulações, como: conformação inicial da proteína, que ligantes estão associados a ela, a presença de outras moléculas no ambiente e a temperatura. Ao compararmos simulações executadas em diferentes condições, torna-se possível identificar os efeitos de uma grande variedade de perturbações moleculares (Hollingsworth & Dror, 2018).

Esta metodologia advém dos princípios da Mecânica Clássica, e, para se chegar às propriedades macroscópicas de interesse, o uso da mecânica estatística é requerido, a qual atua calculando propriedades como pressão, energia interna, energia livre, volume, temperatura e entropia (Namba, V. B. Silva, & C. H. T. P. Silva, 2008). A maioria das estruturas determinadas por difração de raio-X ou método de ressonância magnética nuclear têm sido refinadas com o uso de DM (Alonso, Blyzniuk, & Gready, 2006).

1.7 Campos de força e acessibilidade

Uma vez que o modelo de estudo é definido, as forças atuantes em cada átomo são obtidas por meio de equações derivadas — campos de força — nas quais se alcança a energia potencial da estrutura molecular (Mackerell *et al.*, 1995, 1996; Ott & Meyer, 1996; Kaminski, Friesner, Tirado-Rives, & Jorgensen, 2001) (**Figura 11**). Para se realizar uma simulação, é necessário o cálculo da energia da proteína, que nesse caso é representado por uma função de suas coordenadas atômicas (Ponder & Case, 2003). Na química, o conjunto de funções energéticas potenciais a partir das quais as forças são derivadas é comumente referido como campo de força. Com a evolução e refinamento da DM, as funções atuais da energia das proteínas são de qualidade suficiente para serem usadas no estudo do comportamento enzimático e das interações entre biomoléculas, com fins farmacológicos (Mackerell, 2004).

Os campos de força englobam cálculos que utilizam propriedades moleculares: molas para comprimento de ligação e ângulos, funções periódicas para rotações de ligações e potenciais de Lennard-Jones, e leis de Coulom para interações de van der Waals e eletrostáticas

(Perez, Lankas, Luque, & Orozco, 2008). Nesta direção, é necessário parametrizar estas características, como a rigidez ideal e comprimentos das molas para descrever os comprimentos e ângulos adequados de ligação, as cargas atômicas parciais usadas para calcular as energias de interações eletrostáticas e o raio atômico apropriado em interações van der Waals, entre outros; este conjunto de parâmetros é o que, por fim, determina o termo “campo de força”, que descreve as contribuições das várias forças que definem a trajetória de um complexo biomolecular (Gonzales, 2011).

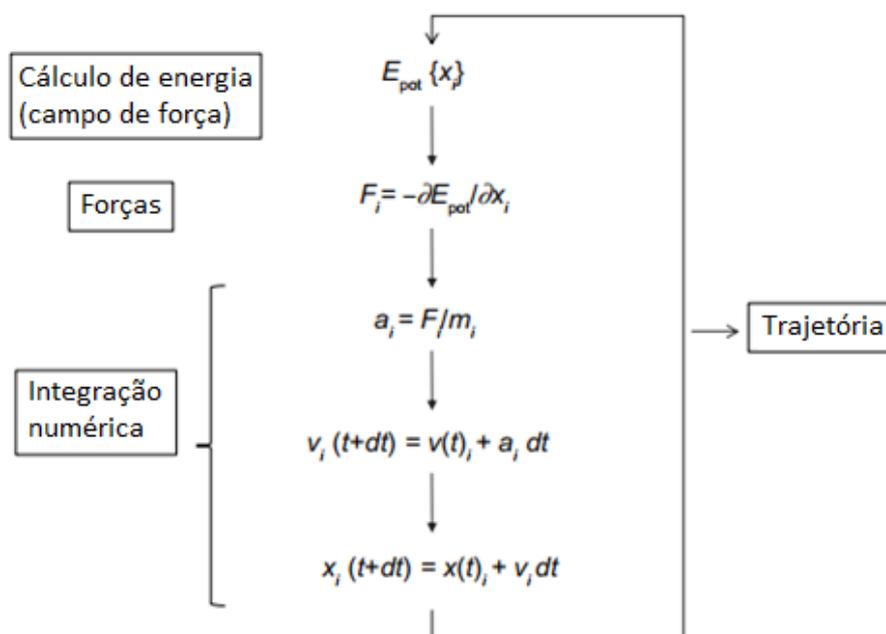


Figura 11. Algoritmo básico de dinâmica molecular.

Notas: O resultado da simulação, a trajetória, é uma lista ordenada de átomos 3N coordenadas para cada tempo de simulação (ou instantâneo).

Abreviações: EPot, energia potencial; t, tempo de simulação; dt, tempo de iteração; para cada coordenada espacial dos N átomos simulados (i): x, coordenada do átomo; F, forças componentes; a, aceleração; m, massa do átomo; v, velocidade

Fonte: “Molecular dynamics simulations: advances and applications”. De Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpi, J. L. (2015). *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 8, 37–47. doi.org/10.2147/AABC.S70333

Uma vez que os resultados das forças atuantes em cada átomo são gerados, leis clássicas de movimento de Newton são aplicadas para se conseguir dados de aceleração e velocidades, necessários para atualizar as posições atômicas em função do tempo. Grande parte dos eventos bioquímicos, como mudanças conformacionais na proteína, podem levar escalas de nanossegundos(ns), microssegundos (ms), ou até mais, dependendo da complexidade da pesquisa. Deste modo, uma simulação usual compõe de milhares a milhões de passos; isso, combinado com milhões de interações interatômicas em cada passo, pode exigir uma demanda computacional alta (Hospital *et al.*, 2015).

Os campos de forças atuais surgiram de forma independente com pacotes de parâmetro específicos. Alguns incluem termos para priorizar e descrever ligações de hidrogênio, outros para acoplar oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação (Ackerman *et al.*, 1988). A qualidade dos resultados é embasada na elaboração de um campo de força com parâmetros bem definidos. A escolha do campo de força varia, em grande parte, do sistema biomolecular e do propósito da investigação.

Na atualidade, as ferramentas computacionais apresentam um arsenal eficiente que se beneficia de paralelismos e aceleradores para catalisar o processo. Os campos de força mais conhecidos (AMBER, (Case *et al.*, 2018), CHARMM, (Brooks *et al.*, 2009), GROMACS (Abraham *et al.*, 2015) e NAMD (Nelson *et al.*, 1996) são compatíveis com a interface de transmissão de mensagens (MPI); e quando um grande número de núcleos de computador pode ser usado em simultâneo, o MPI pode reduzir o tempo exigido para uma tarefa. Apesar de determinado nível de sofisticação computacional e tempo que as simulações exigem, saber as questões passíveis de serem respondidas por meio de simulações, projetar simulações para tratar estas questões, e interpretar os dados resultantes pode ser ainda mais desafiador. Mediante DM é possível alcançar uma grande quantidade de trajetórias que descrevem uma massa de átomos agitados; todavia, tirar resultados e conclusões a partir de um conjunto de números exige conhecimento e experiência na área (Hollingsworth & Dror, 2018).

1.8 Aplicação do Método da Dinâmica Molecular Clássica

A aplicação mais intuitiva do uso da simulação por DM é na análise da motilidade/flexibilidade de regiões de uma biomolécula. Cristalografia por difração de raio-X e Crio-microscopia eletrônica são métodos experimentais de determinação de estrutura que geralmente reproduzem uma biomolécula ao alcance de qualidade mediana. Por análise da simulação de uma estrutura, pode-se verificar o quanto regiões da molécula se movem em equilíbrio e a que tipos de flutuações estruturais elas podem estar passando; além de resíduos estruturais, é possível revelar o comportamento dinâmico de moléculas de água e íons, normalmente parte do solvente, propriedades que frequentemente são críticas à função proteica e interação com o ligante (Bernèche & Roux, 2001; Khafizov *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

Simulações podem ser utilizadas para testar a precisão de um modelo estrutural e até mesmo refiná-lo; geralmente isso é possível ao executá-las a partir da estrutura cristalográfica em uma solução apropriadamente solvatada, e permitir que a estrutura relaxe em um estado de conformação mais favorável (Burg *et al.*, 2015). A preparação de uma simulação envolve uma série de operações necessárias para garantir a qualidade do resultado. Primeiramente, a estrutu-

ra inicial é obtida do experimento; é típico de se esperar erros como: regiões ou resíduos não estruturados, ligantes não padronizados, ou mesmo estruturas com erros na interpretação dos dados experimentais. Dentre as séries de operações padrão de simulações de DM estão: corrigir erros estruturais, ionização de aminoácidos tituláveis, adição de moléculas de água, adicionar contra-íons e solvente, minimização de energia e equilíbrio do sistema na temperatura desejada (Hospital *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo tratou-se de aplicar restrições de movimento em regiões de interesse, alças A e B, de estruturas monoméricas da MtInhA, de modo a comparar o comportamento dessas ao comportamento de estruturas tetraméricas, que já apresentam naturalmente restrições de movimento nessas regiões, e ao comportamento de estruturas monoméricas sem restrições aplicadas. Para isto, através de simulações por Dinâmica molecular clássica, foi possível executar este objetivo e comparar os resultados dos diferentes grupos. Resumidamente, podemos dividir a amostragem em cinco grupos de simulações da MtInhA: i) Monomérico sem restrição, ii) Monomérico com restrições, subdividido em três grupos de acordo com o valor de restrição: a) 0,25kcal, b) 1kcal, e c) 5kcal, e iii) Tetramérico sem restrições.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar três simulações, de 100 ns cada, sobre o modelo da MtInhA monomérico, no complexo binário com o NADH, e sem restrições na SBP.
- Realizar três simulações, de 100 ns cada, sobre o modelo da MtInhA monomérica, no complexo binário com o NADH, e com restrições nas alças A e B. Triplicatas foram organizadas para cada grau de restrição, divididos com base nos valores aplicados (0.25kcal, 1kcal e 5kcal).
- Realizar três simulações, de 100 ns cada, sobre o modelo da MtInhA tetramérico, no complexo binário com o NADH, e sem restrições na SBP.

3 JUSTIFICATIVA

A tuberculose apresenta desafios à engenharia de medicamentos; dentre esses estão a toxicidade do fármaco, tempo de residência dele no sítio ativo, duração do tratamento, e, englobando esses fatores, a efetividade do fármaco.

Vias metabólicas essenciais ao bacilo são frequentemente analisadas na área de estudo de potenciais farmacológicos, como, por exemplo, compostos que atuam em enzimas presentes na segunda via metabólica de biossíntese de ácidos graxos (FAS II) do Mtb (Campbell e Cronan, 2001; White *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Esta rota apresenta a enzima MtInhA, e o estudo de sua estrutura contribui ao entendimento de interações que podem ocorrer em seu sítio catalítico e, conseqüentemente, no potencial de desenvolvimento de medicamentos com ação no Mtb (Agüero *et al.*, 2008).

Cepas MDR-TB persistem aos tratamentos usuais no combate ao bacilo. Este fato induz à pesquisa de novas vias inibitórias ou novos fármacos, que circulem a resistência; neste rumo, questões a respeito da nossa estrutura do alvo precisam ser analisadas, como o contraste da flexibilidade da biomolécula em diferentes modelos estruturais, e o desafio de se trabalhar com um modelo computacional que reproduza a estrutura em condições análogas a seu estado *in vitro*. Dado o exposto, a análise deste trabalho deve considerar: (A) a flexibilidade das alças que compõem a cavidade de ligação ao substrato — SBL, alças A e B — importantes no papel de acomodação de moléculas como substratos, coenzima e ligantes, no sítio catalítico; (B) o quão contrastante e/ou similares são os resultados entre os diferentes grupos; e (C) a contribuição dos nossos dados ao aperfeiçoamento de técnicas computacionais aplicadas a biomoléculas.

4 METODOLOGIA

4.1 Protocolo de aplicação

As simulações foram realizadas com o módulo SANDER do AMBER 18 (Case *et al.*, 2018), usando o modelo de campo de força ff14SB (Maier *et al.*, 2015). O modelo monomérico utilizado foi o 1ENY, configuração binária com NADH, retirado do banco de dados do PDB. O modelo tetramérico da MtInhA foi construído utilizando as matrizes rotacionais e translacionais do 1ENY, binário, criando um conjunto de quatro subunidades na conformação quaternária. Ao todo, a flexibilidade dos sistemas foi avaliada simulando cinco sistemas da MtInhA: (i) tetramérico, (ii) monomérico não restrito, (iii) monomérico restrito a 0,25kcal, (iv) monomérico restrito a 1,00 kcal e (v) monomérico restrito a 5,00 kcal.

O sistema de proteínas foi solvatado em uma caixa limite periódica usando o modelo TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983), com uma extensão de 10,0 Å da superfície da proteína.

Na primeira etapa do protocolo de DM, todos os átomos de hidrogênio, íons e moléculas de água foram submetidos a 1 ns de dinâmica molecular, apenas para permitir que os sistemas fossem equilibrados, enquanto a estrutura proteica era mantida rígida. Os sistemas foram então submetidos à minimização de energia — processo que envolveu restrição aplicada em toda proteína, de 25 kcal até 0 kcal, em 6 passos —, até uma tolerância de $1.000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$, a fim de remover contatos próximos de forças de van der Waals e permitir que os átomos se movessem progressivamente até que estivessem sem restrições. Na terceira fase, aquecimento, a temperatura do sistema foi aumentada de 10K para 298,16K em 7 etapas (10 K para 50 K, 50 K a 100 K, 100 K a 150 K, 150 K a 200 K, 200 K a 250 K, 250 K a 298,16 K, e depois mantido em 298,16 K); esta fase foi realizada em duas etapas: (i) 1,2 ns de aquecimento, seis primeiros passos seguido de (ii) 8,8 ns na sétima etapa a 298,16 K, totalizando 10 ns de fase de aquecimento, antes da fase de produção.

No último passo — produção —, condições de ligação periódicas foram aplicadas, e o número de partículas, pressão e temperatura foram mantidos constante (NTP), 298,16 K; a temperatura constante foi aplicada utilizando o algoritmo de acoplamento fraco (*weak-coupling*), onde um único fator de escala é empregado para todos os átomos, e a pressão constante foi garantida com escala de posição isotrópica, mantida a 1 bar pelo barostato de Berendsen (Berendsen, Postma, van Gunsteren, DiNola, & Haak, 1984). O algoritmo SHAKE (Ryckaert, Ciccotti, & Berendsen, 1977), com uma tolerância padrão de 10^{-5} Å, foi aplicado para restringir todas as ligações contendo um átomo de hidrogênio, permitindo o uso de um in-

tervalo de tempo de 2,0 fs na integração das equações de movimento. As interações eletrostáticas entre átomos não ligados foram avaliadas pelo método de malha de partícula de Ewald, com um espaçamento de 1.0 Å; essa foi interpolada em uma rede cúbica com um conjunto de tolerância ajustada para 5.0×10^{-5} (*default*). Interações de van der Waals foram medidas usando um corte atômico de 9.0 Å (Norberto de Souza & Ornstein, 1999). Realizamos três simulações diferentes para cada sistema MtInhA usando diferentes sementes aleatórias. A fase de produção de cada simulação de MD durou 90 ns. Todas as análises foram realizadas utilizando-se os últimos 90 ns de cada simulação.

4.2 Análise Estrutural

Para descrever a influência da estrutura quaternária na plasticidade da MtInhA, os modelos utilizados foram analisados de acordo com a distância, ângulo e variação da área com base em resíduos-chave presentes na SBP: (i) resíduos da alça A (F97, M98, P99, Q100, T101, G102, M103, G104, I105, N106, P107, F108, F109, D110, A111, P112, Y113, A114, D115, V116, S117, K118, G119, I120, H121), (ii) resíduos da alça B (D150, P151, S152, R153, A154, M155, P156, A157, Y158, N159, W160, M161, T162, V163, A164, K165, S166, A167), e (iii) resíduos da SBL (P193, I194, R195, T196, L197, A198, M199, S200, A201, I202, V203, G204, G205, A206, L207, G208, E209, E210, A211, G212, A213, Q214, I215, Q216, L217, L218, E219, E220, G221, W222, D223, Q224, R225, A226, P227, I228, G229, W230, N231, M232, K233, D234). Um ângulo de pinça — para monitorar a abertura e fechamento da SBP —, foi criado com base no centro de massa dos três motivos estruturais; o resíduo central do ângulo de pinça foi a M97 da alça A, junto dos resíduos P150 e A197, da alça B e SBL, respectivamente. A área de triângulo que se forma a partir do ângulo de pinça foi usada para monitorar as distâncias entre os três motivos — entre alça A e SBL, alça A e alça B, e alça B e SBL (**Figura 12**); esta análise foi aplicada mediante o software Pymol pelo plugin Geo-Measures (Kagami, das Neves, Timmers, Caceres, & Eifler-Lima, 2020), esta ferramenta permitiu que se visualizasse, com base na variação angular, a influência das restrições na movimentação dos resíduos para, assim, comparar o resultado das diferentes estruturas.

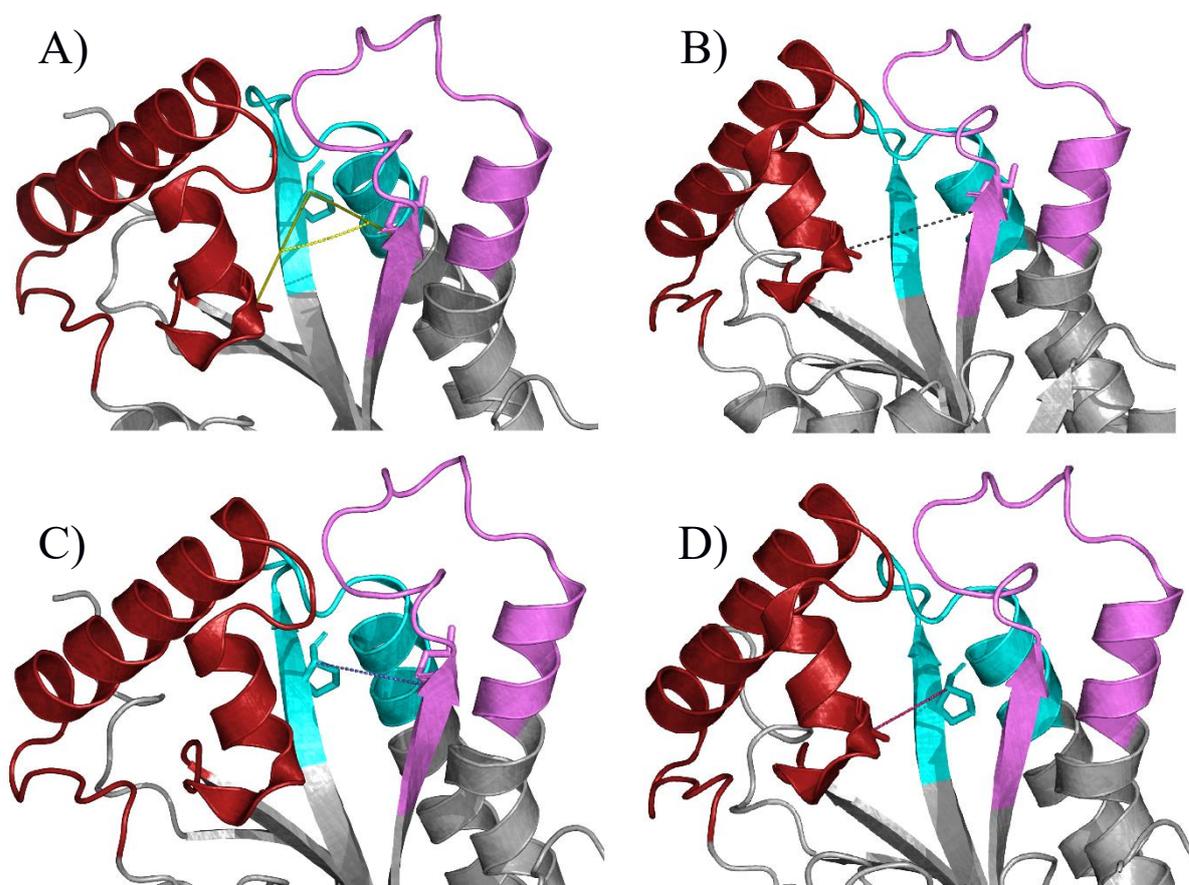


Figura 12. Definição da análise estrutural. A cavidade de ligação ao substrato é definida por três motivos, SBL (vermelho), a alça A (violeta) e a alça B (ciano). (A) Definição do ângulo de pinça e área do triângulo. (B) Distância das alças A e SB. (C) Distância das alças A e B, e (D) Distância das alças A e SB. Imagem gerada com PyMOL (Schrödinger, LLC, 2010).

Capítulo 2

Artigo Científico

Rethinking MtInhA tertiary and quaternary structural flexibility: a molecular dynamics view

Lucas Santos Chitolina^{1,2,3}, Osmar Norberto de Souza^{1,3}, Luiz Augusto Basso^{2,3}, Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers*⁴

¹Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB, PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, RS, 90160-091, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade do Vale do Taquari -Univates, Rua Avelino Talini, 171 - Bairro Universitário, Lajeado, RS, Brazil.

***Corresponding authors: Luis F. S. M. Timmers (luis.timmers@univates.br)**

Abstract

Flexibility and function are related properties in the study of protein dynamics. Flexibility reflects in the conformational potential of proteins and thus in their functionalities. The presence of interactions between protein-ligands and protein-protein complexes, substrates and environmental changes, can alter protein plasticity, acting from the rearrangement of the side chains of amino acids to the folding/unfolding of large structural motifs. To evaluate the effects of the flexibility in protein systems, we defined the enzyme 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, or MtInhA, as our target system. MtInhA is biologically active as a tetramer in solution, however, computational studies commonly use the monomer justifying the independence of its active sites due to their distances. Although, differences in flexibility between tertiary and quaternary structures could present impacts in the size of the active site, influencing the drug discovery process. In this study, we investigated the influence of flexibility's restrictions in A- and B-loops of the MtInhA in order to suggest a monomeric structure that describes the conformational behavior of the tetrameric system. Overall, we observed that simulations where restrictions were applied to the A- and B-loops present a more similar behavior to the native structure when compared to unrestricted simulations. Therefore, our work presents a monomeric model of MtInhA, which has conformational characteristics of the biologically active structure. Thus, the data obtained in this work can be applied to the generation of more reliable flexible models for molecular docking experiments, and also for the performance of longer simulations by molecular dynamics and with a lower computational cost.

Key words: Flexibility; *Mycobacterium tuberculosis*; MtInhA; Molecular dynamics simulation

Introduction

Flexibility and function are related features in the study of protein dynamics, since it reflects on the conformational range, and thus functionality^{1,2,3}. The presence of protein-ligand and protein-protein interactions, the binding of substrates and environmental changes, can impact on protein plasticity, ranging from the rearrangement of amino acid side chains to the folding and unfolding of large structural motifs^{4,5,6}. Subject of several molecular dynamic studies, the flexibility of the enzyme 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis* (Mt), or MtInhA, has been reported due to the conformational changes observed in its binding cavity⁷⁻¹³. Kumar and Shobia, studied the flexibility of the substrate-binding loop (SBL) in the binding of direct InhA inhibitors⁸, reporting a bonding pattern that can be used to characterize an open and closed state of the SBL in the MtInhA⁹, and also applied computational techniques to describe hot-spot residues acting on ligands binding¹⁰. Tonge and coworkers, explored MtInhA plasticity to explain experimental data adjustment of slow-onset inhibitors on the substrate binding pocket (SBP)¹¹. Schroeder and collaborators, described how point mutations, such as I21V, lead to isoniazid resistance; they also identified considerable flexibility of the SBL motif by using the monomeric form of the MtInhA¹².

MtInha, a homotetramer in solution, is a validated target enzyme on tuberculosis treatment¹³. The enzyme active site is composed of three regions: (i) substrate binding loop (SBL), (ii) A-loop and (iii) B-loop. The structural configuration shows A- and B-loops towards the center of the quaternary structure, where protein-protein interactions can be observed between the subjacent subunits, whereas SBL faces to the solvent, out of the tetramer contact¹⁴. Crystallographic structures and molecular dynamics simulations revealed that the binding of ligands on the SBP can influence the flexibility of the main structural motifs of this cavity, SBL, A- and B-loops. However, rigid body docking and molecular dynamics simulations have been applied to MtInhA using a monomeric structure, since it demands less computational cost compared to a tetrameric structure, and also due to the hypothesis that the distance about 40 Å apart from each binding site is sufficient to make them independent¹⁵⁻¹⁷. Recently, Tarabini and coworkers highlighted the importance of the quaternary structure to represent a dynamic ensemble of the MtInhA by computational techniques, suggesting that the monomeric form could lead to conformations that are not observed either in crystallographic structures or by simulations where the tetrameric form is used¹⁸. The tetrameric arrangement indicates that the flexibility of A- and B-loops are affected by the proximity of the subjacent subunit, suggesting

that the quaternary structure has impact on MtInhA plasticity, possibly restraining these motifs movements^{19,20}.

This work proposes a new approach to simulate a tertiary protein structure that describes the dynamic behavior of a quaternary structure, in order to reduce the computational cost for molecular dynamics simulations without compromising the dynamic ensemble. We analyzed the dynamic ensemble of MtInhA by simulating five systems where, in three of them, were applied force constants on A- and B-loops: (i) the tetrameric structure, (ii) monomeric structure without restrictions, (iii) monomeric structure restrained at 0.25 kcal, (iv) monomeric restrained at 1.00 kcal, and (v) monomeric restrained at 5.00 kcal. To compare all simulations, we used probability density functions analysis based on the plasticity of the active site and principal component analysis to evaluate the overall flexibility of the MtInhA.

Material and Methods

MtInhA crystallographic structure

All MD simulations were performed using the binary complex of the MtInhA: NADH, according to the PDB ID 1ENY^{21,22}. The tetramer was generated using the rotational and translational matrices of the crystallographic structure.

Amber protocol

The simulations were performed with the SANDER module of AMBER 18²³, using the *ff14SB* force field model of Maier et al., 2015²⁴. Periodic bound conditions were applied and the NPT ensemble, where the temperature was kept to 298.16 K was used during all simulation time. All systems were solvated using the TIP3P model²⁵, and the constant pressure was guaranteed with an isotropic position scale, maintained at 1 bar by the Berendsen barostat²⁶. The SHAKE algorithm²⁷, with a standard tolerance of 10^{-5} Å, was applied to restrict all bonds containing a hydrogen atom. The electrostatic interactions between unbound atoms were evaluated using the particle mesh Ewald method, with a charge network spacing of 1.0 Å. van der Waals interactions were measured using a 9.0 Å atomic cutoff²⁸. All hydrogen atoms, ions and water molecules were subjected to molecular dynamics for 1.0 ns, to allow the systems to be balanced, while the protein structure was kept rigid. The systems were then submitted to 1,200 steps of steepest-descent and conjugate gradient energy minimization, up to a tolerance of $1,000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$, to remove close contacts of van der Waals forces and allow the atoms to progressively move until they were unrestrained. The temperature was gradually increased from 10 K to 298.16 K in 7 steps (10 K to 50 K, 50 K to 100 K, 100 K to 150 K, 150 K to 200

K, 200 K to 250 K, 250 K to 298.16 K, and then kept at 298.16 K). The first six steps lasted for 200 ps each, and when the temperature reached 298.16 K the systems were equilibrated for 8.8 ns NTP before the production phase. We performed three different simulations for each MtInhA system by using different random seeds. The production phase of each MD simulation lasted for 90 ns and the total simulation time (heating and production) was 100 ns. All analyses were carried out using the last 90 ns of each simulation. The total simulation time was 1.5 μ s.

Structural analysis of the MtInhA enzyme

To describe the influence of the quaternary structure on MtInhA plasticity, the systems were analyzed according to the distance, angle and variation of the area based on residues present in the SBP: (i) A-loop (F97, M98, P99, Q100, T101, G102, M103, G104, I105, N106, P107, F108, F109, D110, A111, P112, Y113, A114, D115, V116, S117, K118, G119, I120, H121), (ii) B-loop (D150, P151, S152, R153, A154, M155, P156, A157, Y158, N159, W160, M161, T162, V163, A164, K165, S166, A167), and (iii) SBL (P193, I194, R195, T196, L197, A198, M199, S200, A201, I202, V203, G204, G205, A206, L207, G208, E209, E210, A211, G212, A213, Q214, I215, Q216, L217, L218, E219, E220, G221, W222, D223, Q224, R225, A226, P227, I228, G229, W230, N231, M232, K233, D234). A pincer angle, to monitor the opening and closing of the SBP, was defined based on the center of mass of the three structural motifs. The central residue of the pincer angle was M98 (A-loop), P151 (B-loop), and A198 (SBL). All these analyses were carried out using the Geo-Measures plugin²⁹.

Results and Discussion

MD simulations were performed to evaluate the impact of restraints on the flexibility of the MtInhA structure. Tarabini and coworkers¹⁸, described that the mobility of A- and B-loops is restricted due to the proximity of the adjacent subunits, where approximately 40 % of the A-loop and 66 % of the B-loop are in contact with the adjacent subunits. It suggests that the quaternary structure implies a mechanism of flexibility regulation. According to these findings, this research aimed to mimic the dynamic behavior of the quaternary structure in a monomeric model by applying force constants to the A- and B-loops in order to restrict the flexibility of these regions.

Comparison of the ensembles

To evaluate the conformational changes in the SBP, we monitored the relationship between the triangle area and the pincer angle. This analysis can be used to describe the process of opening and closing of the active site. According to our results, the unrestrained simulation

presents the ability to sample conformations that are not accessible to other systems. **Figure 1** demonstrates the conformational ensemble of the five groups based on the probability density function. The unrestrained system has a more spread plot, the most representative conformation averaging 33.5 \AA^2 and 79.2 \AA of triangle area and pincer angle, respectively. These results corroborate with the hypothesis that in the absence of adjacent subunits the MtInhA presents a higher flexibility, however, besides the system sample conformations not observed in other simulations, the most representative structure assumed during the simulation time is similar to the tetrameric and restricted simulations. The tetramer and restrained systems (0.25 kcal/mol, 1.00 kcal/mol and 5.00 kcal/mol) showed a more limited area of dispersion. The most representative conformations observed for the triangle area and pincer angle in the tetrameric system were 34.0 \AA^2 and 81.4 \AA , respectively. Regarding the restrained simulations the values of triangle area and pincer angle were 38.0 \AA^2 and 83.3 \AA (0.25 kcal/mol), 35.7 \AA^2 and 77.7 \AA (1.00 kcal/mol), 37.8 \AA^2 and 83.6 \AA (5.00 kcal/mol). Therefore, it can be observed that the system where a force constant of 1.00 kcal/mol was applied showed a more similar distribution when compared to the tetrameric system. These data highlight the impact of the restrictions to reproduce the tetramer flexibility, and thus the importance of the adjacent subunits to the dynamics of the binding site. It is important to highlight that the relationship between the triangle area and pincer angle provides information regarding the size of the SBP, and according to our results, unrestrained simulations should be used with caution if the objective is to generate conformations for docking simulation of a flexible receptor model. Analyses monitoring the relationship between the distances of A-loop: B-loop and A-loop: SBL (**Fig. SF1** and **SF2**) also present a more spread plot for the unrestrained system when compared to restrained and tetrameric systems. These results are in agreement with Tarabini and coworkers¹⁸, where it was noted that monomeric simulations sampled conformations which are not accessible for the quaternary system.

Flexibility of the main structural motifs

The temperature factor (B-factor) is an interesting analysis to evaluate the displacement of atoms, allowing us to highlight what regions are contributing to the protein flexibility. In addition, since our goal is to propose a monomeric system that represents the dynamics behavior of the quaternary structure, it is important to observe what are the impacts of the restrictions on the A- and B-loops to the overall structure. **Figure 2** shows the difference of the B-factor between the simulations and the crystallographic structure. According to our results, we observed that the flexibility of residues composing the Rossmann fold domain are

not affected by the restrictions applied to the simulations 0.25 kcal/mol, 1.00 kcal/mol and 5.00 kcal/mol. These observations can be confirmed by the B-factor analysis where all simulation systems present similar differences when compared to the temperature factor of the crystallographic structure. However, when analyzing regions of the SBP the flexibility does not present the same behavior. It was observed that unrestrained simulations present higher flexibility on the A-loop, B-loop and SBL. Moreover, it is important to highlight the differences between unrestrained and tetrameric simulations, which corroborate the hypothesis that the binding site conformation is perturbed by the presence of the adjacent subunits. These findings have been also observed by Tarabini and coworkers¹⁸, where the SBP presents the largest B-factor between the monomer and tetramer simulations. Regarding the restrained simulations, the flexibility of these regions is well represented compared to the B-factor of the crystallographic structure as well as tetrameric simulations. In this way, our restrained simulation model presents as an interesting approach to describe the dynamic behavior of the tetrameric structure without increasing the computational cost. This is an important finding since our approach could be applied to generate reliable conformations for docking simulations improving the drug discovery process.

Conclusion

Molecular dynamics simulation is a computational biophysical approach widely used to describe the dynamics of macromolecular systems. Therefore, to obtain reliable results it is important to use the biologically active structure of the target, even when the active site is not located at the interface of the adjacent subunits. In order to reduce the computational cost, it is common to observe simulations of tertiary structure instead of the quaternary structure. There are different explanations to carry out a system reduction, for the MtInhA is justified the use of a monomeric system due to the distance between each binding site (≈ 40 Å). However, it was described elsewhere that the presence of adjacent subunits impacts the dynamic behavior of the MtInhA. Since it is a validated target to pursue new antitubercular compounds, we proposed a monomeric model system that describes the flexibility of the quaternary structure that could be used to evaluate the stability of ligands, identified by virtual screening, without losing dynamics information. The comparisons between restrained, unrestrained and tetrameric systems allowed us to suggest a potential monomeric model that represents the conformational features of the tetrameric structure. In addition, it was possible to observe that a force constant of 1.00 kcal/mol was sufficient to mimic the interaction of A- and B-loops with the adjacent subunits of the tetrameric structure. The B-factor results

indicated that the applied restrictions on the A- and B-loops do not compromise the overall flexibility of the MtInhA. To provide reasonable results, computational approaches should consider the constancy of *in silico* and *in vitro* experiments. In this way, our data indicates that unrestricted simulations present differences in the protein flexibility regarding the tetrameric model, whereas restrained simulations are able to better reproduce the dynamics of the tetrameric system, mainly in the SBL, A- and B-loops. We believe that this research comes up with important information to the study of the MtInhA flexibility.

References

1. Tsai, C. J., Kumar, S., Ma, B., & Nussinov, R. (1999). Folding funnels, binding funnels, and protein function. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 8(6), 1181–1190. <https://doi.org/10.1110/ps.8.6.1181>
2. Bahar, I., Chennubhotla, C., & Tobi, D. (2007). Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation. *Current opinion in structural biology*, 17(6), 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.09.011>
3. Henzler-Wildman, K., & Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172), 964–972. <https://doi.org/10.1038/nature06522>
4. Marsh, J. A., Hernández, H., Hall, Z., Ahnert, S. E., Perica, T., Robinson, C. V., & Teichmann, S. A. (2013). Protein complexes are under evolutionary selection to assemble via ordered pathways. *Cell*, 153(2), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.044>
5. Marsh, J. A., & Teichmann, S. A. (2014). Protein flexibility facilitates quaternary structure assembly and evolution. *PLoS biology*, 12(5), e1001870. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001870>
6. Teilum, K., Olsen, J. G., & Kragelund, B. B. (2011). Protein stability, flexibility and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1814(8), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.11.005>
7. da Costa, A. L., Pauli, I., Dorn, M., Schroeder, E. K., Zhan, C. G., & de Souza, O. N. (2012). Conformational changes in 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase (MtInhA) from *M. tuberculosis* induced by an inorganic complex: a molecular dynamics simulation study. *Journal of molecular modeling*, 18(5), 1779–1790. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1200-7>
8. Kumar, V., & Sobhia, M. E. (2013). Characterisation of the flexibility of substrate binding loop in the binding of direct InhA inhibitors. *International journal of computational biology and drug design*, 6(4), 318–342. <https://doi.org/10.1504/IJCBD.2013.056795>
9. Kumar, V., & Sobhia, M. E. (2014). Insights into the bonding pattern for characterizing the open and closed state of the substrate-binding loop in *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *Future medicinal chemistry*, 6(6), 605–616. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.27>
10. Kumar, V., & Sobhia, M. E. (2016). Molecular dynamics-based investigation of InhA substrate binding loop for diverse biological activity of direct InhA inhibitors. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 34(11), 2434–2452. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1118410>
11. Lai, C. T., Li, H. J., Yu, W., Shah, S., Bommineni, G. R., Perrone, V., Garcia-Diaz, M., Tonge, P. J., & Simmerling, C. (2015). Rational Modulation of the Induced-Fit Conformational Change for Slow-Onset Inhibition in *Mycobacterium tuberculosis* InhA. *Biochemistry*, 54(30), 4683–4691. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00284>
12. Schroeder, E. K., Basso, L. A., Santos, D. S., & de Souza, O. N. (2005). Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V, and I16T mutants of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase (MtInhA) in complex with NADH: toward the understanding of NADH-MtInhA different affinities. *Biophysical journal*, 89(2), 876–884. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053512>
13. Takayama, K., Wang, C., & Besra, G. S. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), 81–101. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.81-101.2005>
14. Quémard, A., Sacchetti, J. C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W. R., Jr, & Blanchard, J. S. (1995). Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 34(26), 8235–8241. <https://doi.org/10.1021/bi00026a004>
15. Pauli, I., dos Santos, R. N., Rostirolla, D. C., Martinelli, L. K., Ducati, R. G., Timmers, L. F., Basso, L. A., Santos, D. S., Guido, R. V., Andricopulo, A. D., & Norberto de Souza, O. (2013). Discovery of new inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* MtInhA enzyme using virtual screening and a 3D-pharmacophore-based approach. *Journal of chemical information and modeling*, 53(9), 2390–2401. <https://doi.org/10.1021/ci400202t>
16. Shaw, D. J., Hill, R. E., Simpson, N., Hussein, F. S., Robb, K., Greetham, G. M., Towrie, M., Parker, A. W., Robinson, D., Hirst, J. D., Hoskisson, P. A., & Hunt, N. T. (2017). Examining the role of protein structural dynamics in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical science*, 8(12), 8384–8399. <https://doi.org/10.1039/c7sc03336b>

17. Merget, B., & Sotriffer, C. A. (2015). Slow-Onset Inhibition of Mycobacterium tuberculosis MtInhA: Revealing Molecular Determinants of Residence Time by MD Simulations. *PloS one*, *10*(5), e0127009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127009>
18. Tarabini, R. F., Timmers, L., Sequeiros-Borja, C. E., & Norberto de Souza, O. (2019). The importance of the quaternary structure to represent conformational ensembles of the major Mycobacterium tuberculosis drug target. *Scientific reports*, *9*(1), 13683. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50213-0>
19. Chollet, A., Maveyraud, L., Lherbet, C., & Bernardes-Génisson, V. (2018). An overview on crystal structures of MtInhA protein: Apo-form, in complex with its natural ligands and inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, *146*, 318–343. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.047>
20. Qiu, X., Janson, C. A., Court, R. I., Smyth, M. G., Payne, D. J., & Abdel-Meguid, S. S. (1999). Molecular basis for triclosan activity involves a flipping loop in the active site. *Protein science: a publication of the Protein Society*, *8*(11), 2529–2532. <https://doi.org/10.1110/ps.8.11.2529>
21. Dessen, A., Quémard, A., Blanchard, J. S., Jacobs, W. R., Jr, & Sacchettini, J. C. (1995). Crystal structure and function of the isoniazid target of Mycobacterium tuberculosis. *Science (New York, N.Y.)*, *267*(5204), 1638–1641. <https://doi.org/10.1126/science.7886450>
22. Rozwarski, D. A., Vilchèze, C., Sugantino, M., Bittman, R., & Sacchettini, J. C. (1999). Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, MtInhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. *The Journal of biological chemistry*, *274*(22), 15582–15589. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15582>
23. Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D.S., Cheatham, T.E., Cruzeiro, V.W.D., ... Kollman, P.A. (2019), AMBER 2019, University of California, San Francisco.
24. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of chemical theory and computation*, *11*(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
25. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, & M. Klein. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* *79*:926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
26. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, *81*, 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
27. Ryckaert, J. P., G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. (1977). Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* *23*: 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
28. Norberto de Souza, O., & Ornstein, R. L. (1999). Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, *16*(6), 1205–1218. <https://doi.org/10.1080/07391102.1999.10508328>
29. Kagami, L. P., das Neves, G. M., Timmers, L. F. S. M., Caceres, R. A., Eifler-Lima, V. L. (2020). Geo-Measures: A PyMOL plugin for protein structure ensembles analysis, *Computational Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107322>
30. Schrödinger, LLC (2010). “The PyMOL Molecular Graphics System”. Version 2.3.2.
31. Plotly Technologies Inc. Collaborative data science. Porto Alegre, BR, 2021

Acknowledgments

We would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant number: 407537/2018); the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, financial code 001).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Figures

Figure 1. Conformational ensembles of the MtInhA associated with NADH. The probability density plots of (A) Tetramer, (B) Unrestrained, and the restrained systems (C) 0.25 kcal/mol, (D) 1.00 kcal/mol, and (E) 5.00 kcal/mol, highlights the differences of the protein dynamics regarding the variability of the binding cavity. Image generated with PyMOL³⁰ plugin Geomeasures²⁹.

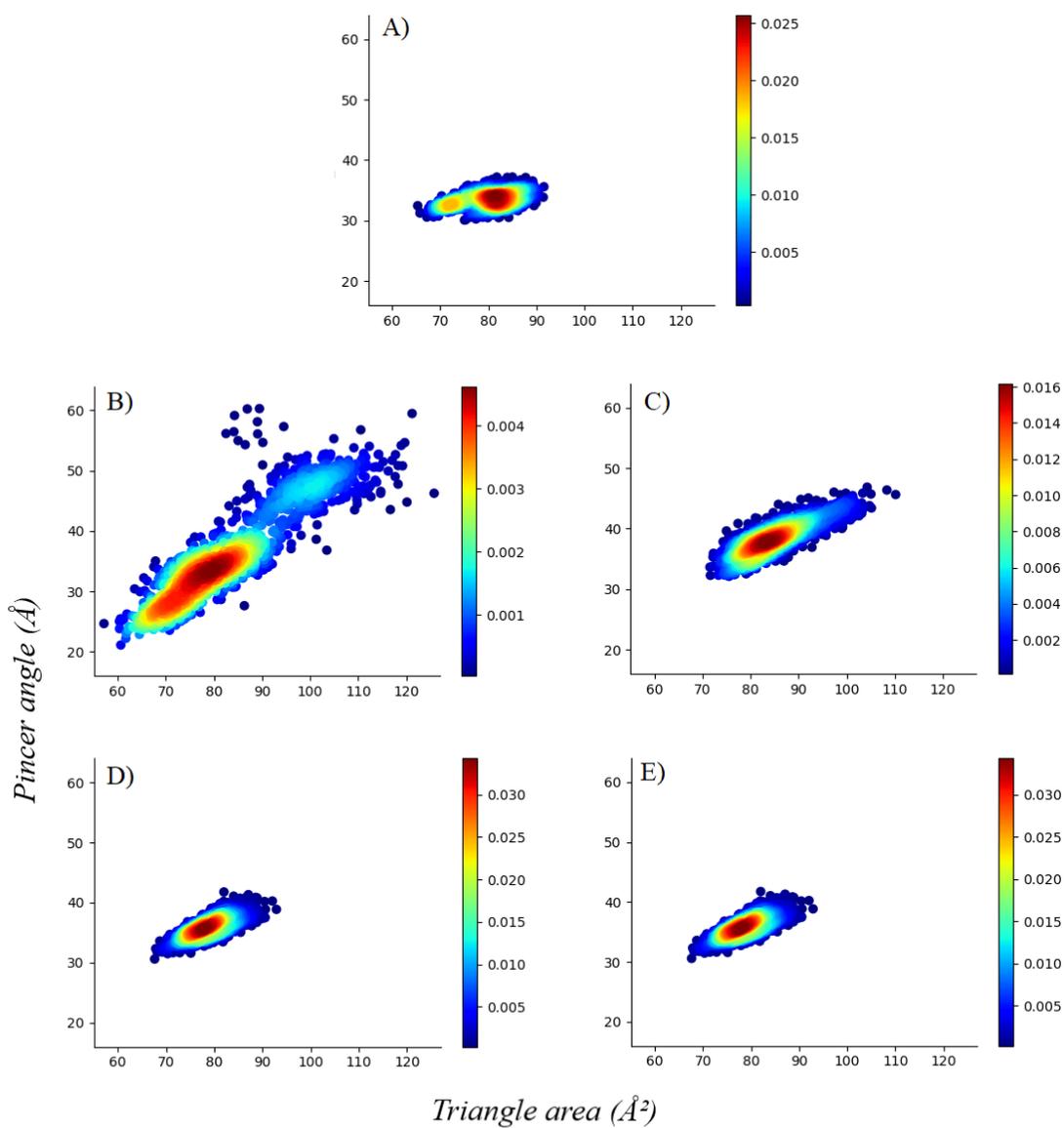
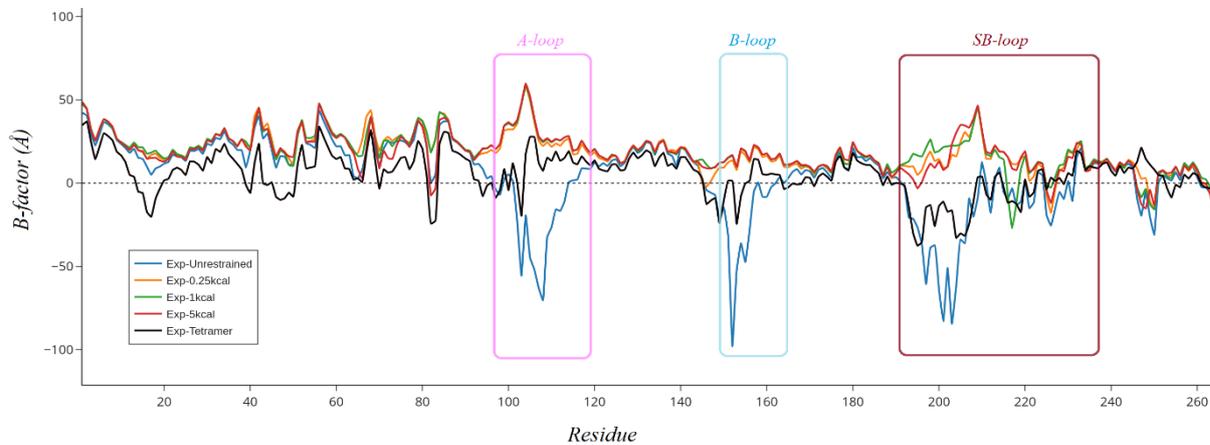


Figure 2. Flexibility of the MtInhA structure according to different simulation systems. The figure shows the difference of the B-factor values for all systems when compared to the crystallographic structure. The regions A-loop, B-loop, and SBL are highlighted with boxes and colored in violet, blue and red, respectively. Image generated with Plotly³¹.



SUPPLEMENTARY INFORMATION:

Rethinking MtInhA tertiary and quaternary structural flexibility: a molecular dynamics view

Lucas Santos Chitolina^{1,2,3}, Osmar Norberto de Souza^{1,3}, Luiz Augusto Basso^{2,3}, Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers*⁴

¹Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB, PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, RS, 90160-091, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade do Vale do Taquari -Univates, Rua Avelino Talini, 171 - Bairro Universitário, Lajeado, RS, Brazil.

***Corresponding authors: Luis F. S. M. Timmers (luis.timmers@univates.br)**

Figure SF1. Monomeric and tetrameric structures used in the molecular dynamics simulations studies. (A) MtInhA monomeric form (1ENY) and (B) MtInhA tetrameric form (1BVR).

Figure SF2. Probability density plots of distance of SB-loop and A-loop by the distance of A-loop and B-loop. (A) Tetramer, (B) Unrestrained, followed by the restrained ones (C) 0.25kcal, and (D) 1kcal and (E) 5kcal.

Figure SF3. Probability density plots of distance of SB-loop and B-loop by the distance of A-loop and B-loop. (A) Tetramer, (B) Unrestrained, followed by the restrained ones (C) 0.25kcal, and (D) 1kcal and (E) 5kcal.

Figure SF4. Flexibility of the MtInhA simulations. The figure shows the difference of the B-factors values for all systems when compared to the Tetramer system.

Figure SF1. Monomeric and tetrameric forms used in the molecular dynamics simulations studies. (A) MtInhA monomeric form (1ENY) and (B) MtInhA tetrameric form (1BVR). Image generated with PyMOL³⁰.

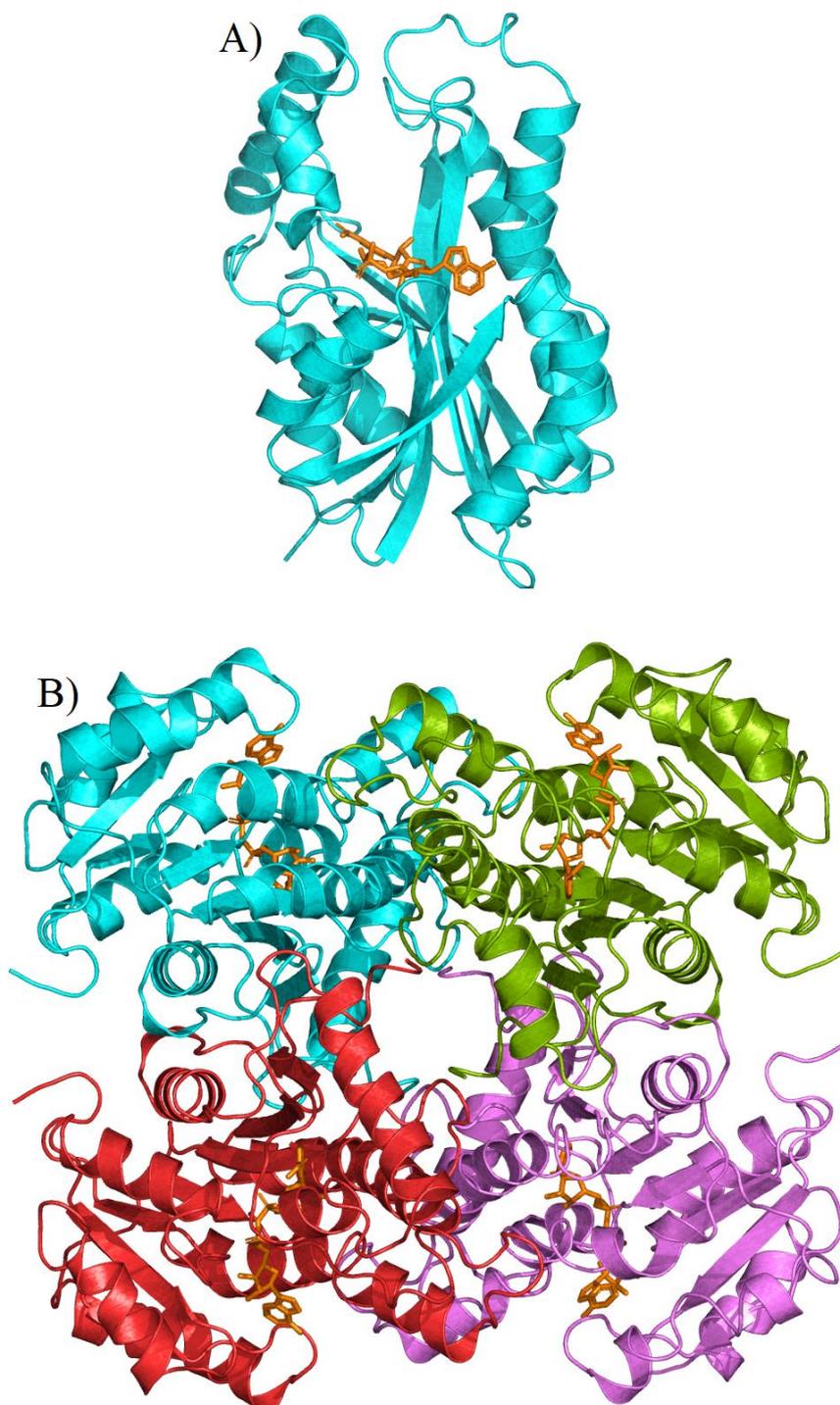


Figure SF2. Probability density plots of distance of SB-loop and A-loop by the distance of A-loop and B-loop. (A) Tetramer, (B) Unrestrained, followed by the restrained ones (C) 0.25kcal, and (D) 1kcal and (E) 5kcal. Image generated with PyMOL³⁰ plugin Geomeasures²⁹.

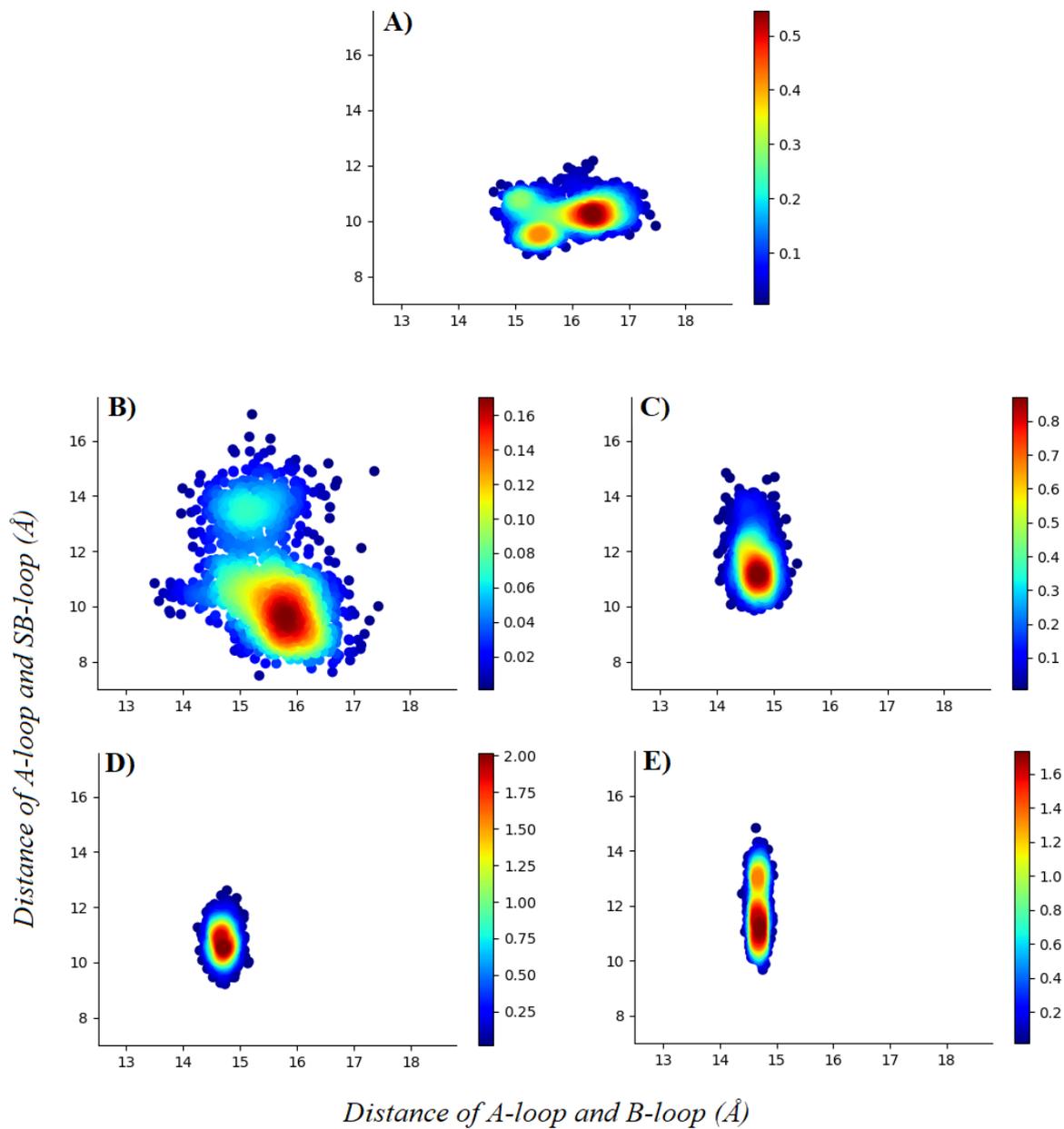


Figure SF3. Probability density plots of distance of SB-loop and B-loop by the distance of A-loop and B-loop. (A) Tetramer, (B) Unrestrained, followed by the restrained ones (C) 0.25kcal, and (D) 1kcal and (E) 5kcal. Image generated with PyMOL³⁰ plugin Geomeasures²⁹.

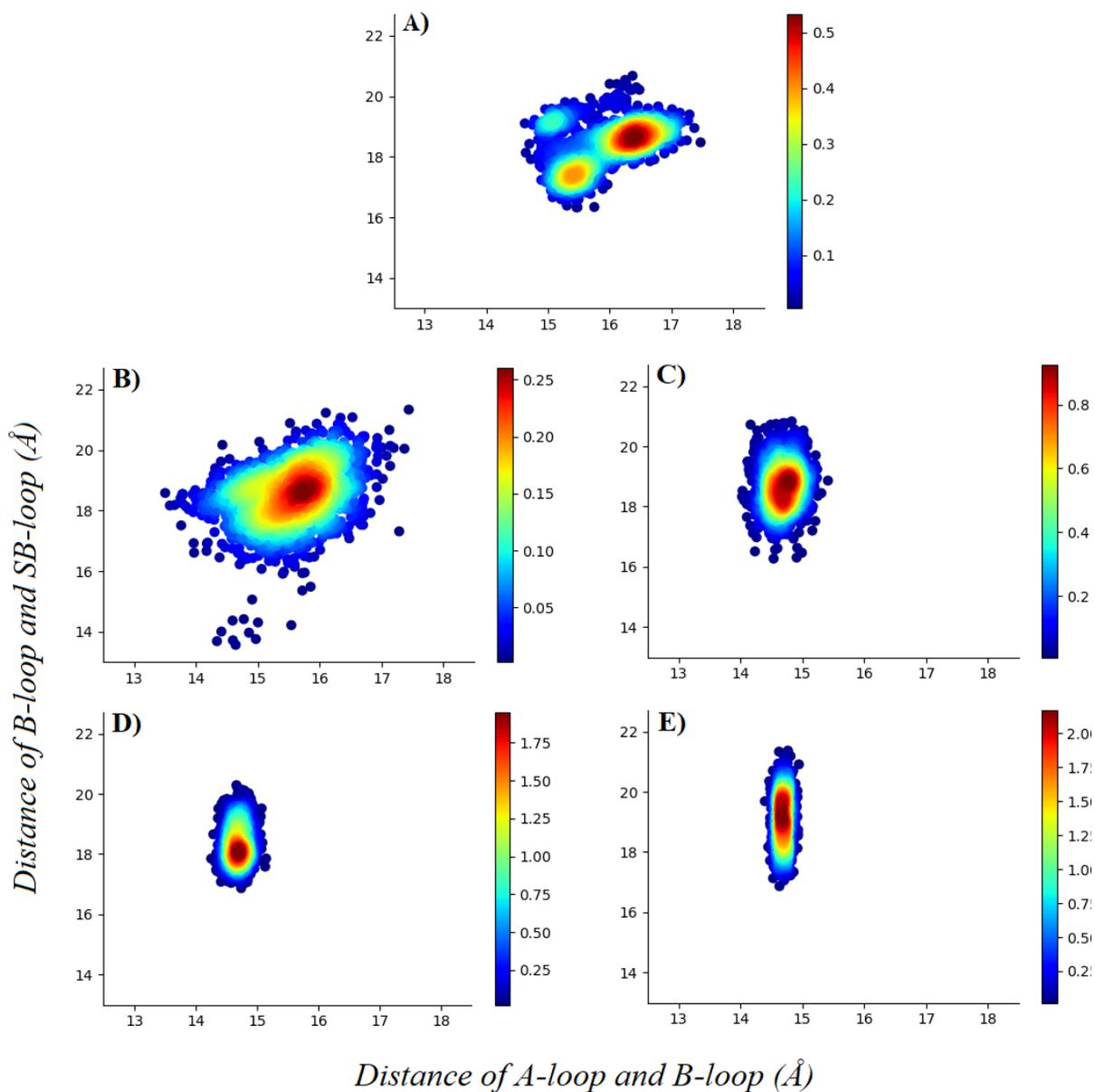
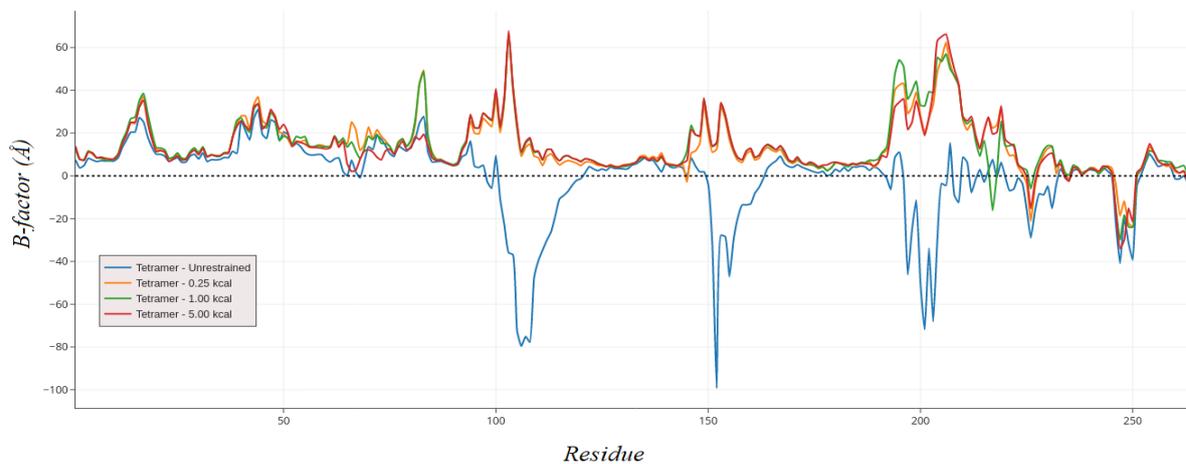


Figure SF4. Flexibility of the MtInhA simulations. The figure shows the difference of the B-factors values for all systems when compared to the Tetramer system. Image generated with Plotly³¹.



Capítulo 3

Considerações finais

Perspectivas

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Flexibilidade e função são sinônimos no estudo da dinâmica proteica. As proteínas têm capacidade de sofrer transições conformacionais funcionalmente relevantes, sob condições de estado nativo. A flexibilidade reflete em potencial conformacional, e consequente funcionalidade; essa propriedade é importante ao reconhecimento biomolecular. A presença de ligantes, substratos, mudanças no ambiente (pH, íons, temperatura) pode alterar o nível de plasticidade da proteína atuando desde a variação no rearranjo de cadeias laterais de aminoácidos até no desdobramento/dobramento de grandes motivos estruturais.

A enzima alvo deste estudo é biologicamente ativa na forma de um homotetrâmero, quatro monômeros iguais, contendo 269 resíduos de aminoácidos. Seu sítio ativo abriga substratos de tamanhos variados, de 16 a 56 carbonos; a catálise desta variedade biomolecular demanda flexibilidade dos motivos estruturais que compõem esta região.

Ao visar estudar a flexibilidade da proteína MtInhA em diferentes estados, este trabalho utilizou simulações computacionais por meio da dinâmica molecular clássica. O objetivo da pesquisa foi focado em realizar simulações em modelos monoméricos da MtInhA visando aproximar o comportamento monomérico ao tetramérico, o qual apresenta conformação estrutural da proteína biologicamente ativa. Para este fim, foram aplicadas restrições de movimento nos motivos estruturais dos monômeros, alças A e B, conjuntos que sofrem restrições de flexibilidade pelas subunidades adjacentes, na estrutura tetramérica.

As simulações foram divididas em cinco grupos: i) Tetrâmero, ii) Monômero sem restrição, e os três restantes, modelos monoméricos com restrições aplicadas, classificados a partir de seus valores em quilocalorias, iii) 0.25kcal, iv) 1kcal, e v) 5kcal.

As análises em variações de ângulo, área, distância entre resíduos-chave dos motivos da SBP e fator-B, permitiu notar que os modelos monoméricos com restrições e o modelo tetramérico apresentaram maior similaridade, principalmente nos motivos A e B; o modelo monomérico sem restrição apresentou resultados mais destoantes em todas as análises. Este resultado sugere que a utilização de um modelo monomérico com restrição nessas regiões — em relação ao modelo monomérico sem restrições — pode representar de forma mais autêntica o comportamento da estrutura biologicamente ativa.

As comparações entre sistemas restritos, não restritos e tetraméricos nos permitiram sugerir um modelo monomérico potencial que representa as características conformacionais da estrutura tetramérica. Além disso, foi possível observar que uma constante de força de 1,00 kcal / mol foi suficiente para mimetizar a interação das alças A e B com as subunidades

adjacentes da estrutura tetramérica. Os resultados do fator-B indicaram que as restrições aplicadas nos loops A e B não comprometem a flexibilidade geral da MtInhA. Suspeitava-se que as restrições aplicadas nos motivos poderiam influenciar em uma flexibilidade extra sobre a SBL, esta teoria não se confirmou pelos dados obtidos, uma vez que as simulações não indicaram aumento de flexibilidade em razão ao aumento do valor de restrição.

Como visto em pesquisas anteriores, há distinção entre o comportamento de estruturas monoméricas e tetraméricas da MtInhA, e tal diferença pode implicar na função proteica e em potenciais interações com ligantes. A partir disto, a distância entre as cavidades de ligação (≈ 40 Å) dos monômeros não justifica a utilização do modelo, pois ignora propriedade importante da proteína funcional. Aplicações computacionais devem aproximar ao maior alcance a fidelidade do modelo *in silico* com a forma biologicamente ativa, para entregar um resultado válido. Nossos dados indicam que um modelo monomérico sem restrições apresenta diferença na flexibilidade em relação ao modelo tetramérico; em contraste, os monômeros com restrições mostraram comportamento mais próximo ao conjunto tetramérico, principalmente na SBL, A- e B-loops. Estas conclusões foram obtidas através da análise e interpretação das variações de ângulo, área, distância entre resíduos-chave e fator B. Acreditamos que esta pesquisa adiciona dados importantes ao estudo da flexibilidade da MtInhA e questiona a maneira como processos computacionais, MM/DM e docagem de proteínas, podem ser executados sobre estruturas dinâmicas.

5 REFERÊNCIAS

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Pall, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
- Ackermann, T. (1990). C. L. Brooks III, M. Karplus, B. M. Pettitt. Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics, Volume LXXI, in: Advances in Chemical Physics, John Wiley & Sons, New York 1988. 259
- Agüero, F., Al-Lazikani, B., Aslett, M., Berriman, M., Buckner, F. S., Campbell, R. K., ... Verlinde, C. L. (2008). Genomic-scale prioritization of drug targets: the TDR Targets database. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(11), 900–907. <https://doi.org/10.1038/nrd2684>
- Alder, B., & Wainwright, T. (1959). Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. *Journal of Chemical Physics*, 31, 459-466.
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a021113. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>
- Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Gready, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal research reviews*, 26(5), 531–568. <https://doi.org/10.1002/med.20067>
- Asselineau, C., & Asselineau, J. (1978). Trehalose-containing glycolipids. *Progress in the chemistry of fats and other lipids*, 16, 59–99. [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(78\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0079-6832(78)90037-x)
- Bahar, I., Chennubhotla, C., & Tobi, D. (2007). Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation. *Current opinion in structural biology*, 17(6), 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.09.011>
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., & Jacobs, W. R., Jr (1994). MtInhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5144), 227–230. <https://doi.org/10.1126/science.8284673>
- Barry, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., & Yuan, Y. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research*, 37(2-3), 143–179. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(98\)00008-3](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(98)00008-3)
- Basso, L. A., Schneider, C. Z., Santos, A. J. A. B. dos, Santos Jr, A. A. dos., Campos, M. M., Souto, A. A., & Santos, D. S. (2010). An inorganic complex that inhibits Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(7), 1384-1389. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700026>
- Bax, R. P. (1997). Antibiotic resistance: a view from the pharmaceutical industry. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24 Suppl 1, S151–S153. https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_1.s151
- Becker, K., & Sander, P. (2016). Mycobacterium tuberculosis lipoproteins in virulence and immunity - fighting with a double-edged sword. *FEBS letters*, 590(21), 3800–3819. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12273>

- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, *81*, 3684-3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>
- Bernèche, S., & Roux, B. (2001). Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature*, *414*(6859), 73–77. <https://doi.org/10.1038/35102067>
- Bernstein, J., Lott, W. A., Steinberg, B. A., & Yale, H. L. (1952). Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *American review of tuberculosis*, *65*(4), 357–364. <https://doi.org/10.1164/art.1952.65.4.357>
- Bhatt, A., Kremer, L., Dai, A. Z., Sacchettini, J. C., & Jacobs, W. R., Jr (2005). Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *Journal of bacteriology*, *187*(22), 7596–7606. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7596-7606.2005>
- Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R., Jr, & Kremer, L. (2007). The Mycobacterium tuberculosis FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Molecular microbiology*, *64*(6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05761.x>
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, *64*, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>
- Brooks, B.R., Brooks III, C.L., Mackerell Jr., A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., ... Kuczer, K. (2009) CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry*, *30*, 1545-1614. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Brown, A. K., Sridharan, S., Kremer, L., Lindenberg, S., Dover, L. G., Sacchettini, J. C., & Besra, G. S. (2005). Probing the mechanism of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III mtFabH: factors influencing catalysis and substrate specificity. *The Journal of biological chemistry*, *280*(37), 32539–32547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413216200>
- Burg, J. S., Ingram, J. R., Venkatakrishnan, A. J., Jude, K. M., Dukkipati, A., Feinberg, E. N., Angelini, A., Waghay, D., Dror, R. O., Ploegh, H. L., & Garcia, K. C. (2015). Structural biology. Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, *347*(6226), 1113–1117. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5026>
- Campbell, J. W., & Cronan, J. E., Jr (2001). Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annual review of microbiology*, *55*, 305–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.305>
- Carlson, H. A., & McCammon, J. A. (2000). Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Molecular pharmacology*, *57*(2), 213–218
- Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D.S., Cheatham, T.E., Cruzeiro, V.W.D., ... Kollman, P.A. (2018), AMBER 2018, University of California, San Francisco.
- Chollet, A., Maveyraud, L., Lherbet, C., & Bernardes-Génisson, V. (2018). An overview on crystal structures of MtInhA protein: Apo-form, in complex with its natural ligands and inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, *146*, 318–343. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.047>

- Chan, J., & Kaufmann, S. H. E. (1994). Immune mechanisms of protection in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control (B. R. Bloom, ed.), *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., pp. 389–415. <https://doi.org/10.1128/9781555818357.ch24>
- Cohen, E. M., Machado, K. S., Cohen, M., & Norberto de Souza, O. (2011). Effect of the explicit flexibility of the MtInhA enzyme from Mycobacterium tuberculosis in molecular docking simulations. *BMC Genomics* 12, S7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S4-S7>
- Cozzini, P., Kellogg, G. E., Spyraakis, F., Abraham, D. J., Costantino, G., Emerson, A., ... Sottriffer, C. A. (2008). Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design. *Journal of medicinal chemistry*, 51(20), 6237–6255. <https://doi.org/10.1021/jm800562d>
- da Costa, A. L., Pauli, I., Dorn, M., Schroeder, E. K., Zhan, C. G., & de Souza, O. N. (2012). Conformational changes in 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase (MtInhA) from M. tuberculosis induced by an inorganic complex: a molecular dynamics simulation study. *Journal of molecular modeling*, 18(5), 1779–1790. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1200-7>
- Dessen, A., Quémard, A., Blanchard, J. S., Jacobs, W. R., Jr, & Sacchettini, J. C. (1995). Crystal structure and function of the isoniazid target of Mycobacterium tuberculosis. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5204), 1638–1641. <https://doi.org/10.1126/science.7886450>
- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V. P., Lanéelle, M. A., Yu, K., ... Daffé, M. (2000). Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Molecular microbiology*, 36(3), 630–637. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01882.x>
- Erickson, J. A., Jalaie, M., Robertson, D. H., Lewis, R. A., & Vieth, M. (2004). Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(1), 45–55. <https://doi.org/10.1021/jm030209y>
- Feixas, F., Lindert, S., Sinko, W., & McCammon, J. A. (2014). Exploring the role of receptor flexibility in structure-based drug discovery. *Biophysical chemistry*, 186, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.10.007>
- Fischl, M. A., Daikos, G. L., Uttamchandani, R. B., Poblete, R. B., Moreno, J. N., Reyes, R. R., Boota, A. M., Thompson, L. M., Cleary, T. J., & Oldham, S. A. (1992). Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multiple-drug-resistant bacilli. *Annals of internal medicine*, 117(3), 184–190. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-117-3-184>
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. A., & Bigi, F. (2013). *Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex*. *Virulence*, 4(1), 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>
- Fox H. H. (1952). The chemical approach to the control of tuberculosis. *Science (New York, N.Y.)*, 116(3006), 129–134. <https://doi.org/10.1126/science.116.3006.129>
- Fu, L. M., & Fu-Liu, C. S. (2002). Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 82(2-3), 85–90. <https://doi.org/10.1054/tube.2002.0328>

- Games, P., & Howell, J. (1976). Pairwise Multiple Comparison Procedures with Unequal N's and/or Variances: A Monte Carlo Study. *Journal of Educational Statistics*, 1(2), 113-125. <https://doi.org/10.2307/1164979>
- George, K. M., Yuan, Y., Sherman, D. R., & Barry, C. E., 3rd (1995). The biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification and functional analysis of CMAS-2. *The Journal of biological chemistry*, 270(45), 27292–27298. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27292>
- Glickman, M. S., Cox, J. S., & Jacobs, W. R., Jr (2000). A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular cell*, 5(4), 717–727. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80250-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80250-6)
- Glickman, M. S., Cahill, S. M., & Jacobs, W. R., Jr (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* *cmaA2* gene encodes a mycolic acid trans-cyclopropane synthetase. *The Journal of biological chemistry*, 276(3), 2228–2233. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000652200>
- González, M. A. (2011). “Force fields and molecular dynamics simulations”. *École thématique de la Société Française de la Neutronique 12*: 169-200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>
- Heath, R. J., White, S. W., & Rock, C. O. (2001). Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Progress in lipid research*, 40(6), 467–497. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(01\)00012-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(01)00012-1)
- Henzler-Wildman, K., & Kern, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172), 964–972. <https://doi.org/10.1038/nature06522>
- Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of chemical theory and computation*, 4(3), 435–447. <https://doi.org/10.1021/ct700301q>
- Hijjar, Miguel Aiub, Gerhardt, Germano, Teixeira, Gilmário M, & Procópio, Maria José. (2007). Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 41(Supl. 1), 50-57. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102007000800008>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpi, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 8, 37–47. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>
- Hunter, R. L., Olsen, M., Jagannath, C., & Actor, J. K. (2006). Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice. *The American journal of pathology*, 168(4), 1249–1261. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050848>
- Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). *Assembly of the Mycobacterial Cell Wall*. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 405-423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
- Johnsson, K., & Schultz, P. (1994). Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 7425-7426. <https://doi.org/10.1021/ja00095a063>

- Johnsson, K., D. S. King, & P. G. Schultz. (1995). Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5009–5010. <https://doi.org/10.1021/ja00122a038>
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, & M. Klein. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79:926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Kagami, L. P., das Neves, G. M., Timmers, L. F. S. M., Caceres, R. A., Eifler-Lima, V. L. (2020). Geo-Measures: A PyMOL plugin for protein structure ensembles analysis, Computational Biology and Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2020.107322>
- Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W. L. (2001). Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 6474–6487. <https://doi.org/10.1021/jp003919d>
- Karplus, M., & Petsko, G. A. (1990). Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, 347(6294), 631–639. <https://doi.org/10.1038/347631a0>
- Karplus, M., & McCammon, J. A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology*, 9(9), 646–652. <https://doi.org/10.1038/nsb0902-646>
- Kessler, R. E. (1997,01) Perspectives on Chemotherapeutic Approaches to Antibiotic-Resistant Bacteria, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 24, Issue Supplement_1, January, Pages S146–S147, https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement_1.S146
- Khafizov, K., Perez, C., Koshy, C., Quick, M., Fendler, K., Ziegler, C., & Forrest, L. R. (2012). Investigation of the sodium-binding sites in the sodium-coupled betaine transporter BetP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), E3035–E3044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209039109>
- Kruh, N. A., Rawat, R., Ruzsicska, B. P., & Tonge, P. J. (2007). Probing mechanisms of resistance to the tuberculosis drug isoniazid: Conformational changes caused by inhibition of MtInhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 16(8), 1617–1627. <https://doi.org/10.1110/ps.062749007>
- Kolattukudy, P. E., Fernandes, N. D., Azad, A. K., Fitzmaurice, A. M., & Sirakova, T. D. (1997). Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular microbiology*, 24(2), 263–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3361705.x>
- Kumar, V., & Sobhia, M. E. (2013). Characterisation of the flexibility of substrate binding loop in the binding of direct MtInhA inhibitors. *International journal of computational biology and drug design*, 6(4), 318–342. <https://doi.org/10.1504/IJCBDD.2013.056795>
- Kumar, V., & Sobhia, M. E. (2014). Insights into the bonding pattern for characterizing the open and closed state of the substrate-binding loop in Mycobacterium tuberculosis MtInhA. *Future medicinal chemistry*, 6(6), 605–616. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.27>
- Kumar, V., & Sobhia, M. E. (2016). Molecular dynamics-based investigation of MtInhA substrate binding loop for diverse biological activity of direct MtInhA inhibitors. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 34(11), 2434–2452. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1118410>

- Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J. F., & Wietzerbin, J. (1975). Cell walls of Mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Molecular and cellular biochemistry*, 7(2), 87–104. <https://doi.org/10.1007/BF01792076>
- Li, J., Shaikh, S. A., Enkavi, G., Wen, P. C., Huang, Z., & Tajkhorshid, E. (2013). Transient formation of water-conducting states in membrane transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7696–7701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218986110>
- Mackerell, A. D., Wiorkiewicz-Kuczera, J., Karplus, M. (1995). An all-atom empirical energy function for the simulation of nucleic-acids. *J Am Chem Soc.* 117(48):11946–11975
- MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., ... Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry. B*, 102(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>
- Mackerell A. D., Jr (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: overview and issues. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1584–1604. <https://doi.org/10.1002/jcc.20082>
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of chemical theory and computation*, 11(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>
- Marrakchi, H., Zhang, Y. M., & Rock, C. O. (2002). Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochemical Society transactions*, 30(Pt 6), 1050–1055. <https://doi.org/10.1042/bst0301050>
- Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., & Daffé, M. (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & biology*, 21(1), 67–85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>
- McKinney, J.D., Jacobs, W.R.Jr. & Bloom, B.R. (1998). Persistent problems in tuberculosis, in Emerging Infections (Krause, R.M. Ed.), *Academic Press, New York*, pp. 51-146.
- McNeil, M., Daffe, M., & Brennan, P. J. (1991). Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *The Journal of biological chemistry*, 266(20), 13217–13223.
- Minnikin, D. E. (1982). Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles, p. 95–184. In C. Ratledge and J. Stanford (ed.), *The biology of the mycobacteria 1*. Physiology, identification and classification. Academic Press, New York, N.Y.
- Namba, A. M., Silva, V. B. da, & Silva, C. H. T. P. da. (2008). Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, 33(4), 13-24. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702008000400002>
- Nelson, M. T., Humphrey, W., Gursoy, A., Dalke, A., Kalé, L. V., Skeel, R. D., & Schulten, K. (1996). NAMD: a Parallel, Object-Oriented Molecular Dynamics Program. *The International Journal of Supercomputer Applications and High-Performance Computing*, 10(4), 251–268. <https://doi.org/10.1177/109434209601000401>
- Norberto de Souza, O., & Ornstein, R. L. (1999). Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to stan-

- dard cutoff model. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 16(6), 1205–1218. <https://doi.org/10.1080/07391102.1999.10508328>
- Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W. R., Jr, & Hatfull, G. F. (2005). GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*, 123(5), 861–873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.012>
- Ott, K., & Meyer, B. (1996). Parametrization of GROMOS force field for oligosaccharides and assessment of efficiency of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 17.
- Pauli, I., dos Santos, R. N., Rostirolla, D. C., Martinelli, L. K., Ducati, R. G., Timmers, L. F., Basso, L. A., Santos, D. S., Guido, R. V., Andricopulo, A. D., & Norberto de Souza, O. (2013). Discovery of new inhibitors of Mycobacterium tuberculosis MtInhA enzyme using virtual screening and a 3D-pharmacophore-based approach. *Journal of chemical information and modeling*, 53(9), 2390–2401. <https://doi.org/10.1021/ci400202t>
- Parikh, S. L., Xiao, G., & Tonge, P. J. (2000). Inhibition of MtInhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry*, 39(26), 7645–7650. <https://doi.org/10.1021/bi0008940>
- Pérez, A., Lankas, F., Luque, F. J., & Orozco, M. (2008). Towards a molecular dynamic consensus view of B-DNA flexibility. *Nucleic acids research*, 36(7), 2379–2394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn082>
- Ponder, J. W., & Case, D. A. (2003). Force fields for protein simulations. *Advances in protein chemistry*, 66, 27–85. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(03\)66002-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(03)66002-x)
- Punkvang, A., Saparpakorn, P., Hannongbua, S., Wolschann, P., Beyer, A., & Pungpo, P. (2010). Investigating the structural basis of arylamides to improve potency against M. tuberculosis strain through molecular dynamics simulations. *European journal of medicinal chemistry*, 45(12), 5585–5593. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.008>
- Qiu, X., Janson, C. A., Court, R. I., Smyth, M. G., Payne, D. J., & Abdel-Meguid, S. S. (1999). Molecular basis for triclosan activity involves a flipping loop in the active site. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 8(11), 2529–2532. <https://doi.org/10.1110/ps.8.11.2529>
- Quéward, A., Sacchettini, J. C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W. R., Jr, & Blanchard, J. S. (1995). Enzymatic characterization of the target for isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry*, 34(26), 8235–8241. <https://doi.org/10.1021/bi00026a004>
- Quéward, A., A. Dessen, M. Sugantino, W. R. Jacobs Jr., J. C. Sacchettini, and J. S. Blanchard. (1996). Binding of catalase-peroxidase-activated isoniazid to wild-type and mutant *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductases. *J. Am. Chem. Soc.* 118:1561–1562
- Ryckaert, J. P., G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. (1977). Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* 23: 327–341. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
- Riley, M., & Labedan, B. (1996). *Escherichia coli* genes products: physiological functions and common ancestries, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Barton, D. H., Jacobs, W. R., Jr, & Sacchettini, J. C. (1998). Modification of the NADH of the isoniazid target (MtInhA) from Mycobacterium

- tuberculosis. *Science* (New York, N.Y.), 279(5347), 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.279.5347.98>
- Ruffino Netto, Antonio. (1999). Impacto da reforma do setor saúde sobre os serviços de tuberculose no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária*, 7(1), 7-18. http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103460X1999000100002&lng=pt&tlng=
- Sacchettini, J. C., & Blanchard, J. S. (1996). The structure and function of the isoniazid target in M. tuberculosis. *Research in microbiology*, 147(1-2), 36–43. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80201-4](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80201-4)
- Sant'Anna, C. M. R. (2009). Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. *Revista Virtual de Química*, 1(1), 49–57. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090007>
- Scarsdale, J. N., Kazanina, G., He, X., Reynolds, K. A., & Wright, H. T. (2001). Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *The Journal of biological chemistry*, 276(23), 20516–20522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010762200>
- Schrödinger, LLC (2010). “The PyMOL Molecular Graphics System”. Version 2.3.2.
- Schroeder, E. K., de Souza, N., Santos, D. S., Blanchard, J. S., & Basso, L. A. (2002). Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *Current pharmaceutical biotechnology*, 3(3), 197–225. <https://doi.org/10.2174/1389201023378328>
- Schroeder, E. K., Basso, L. A., Santos, D. S., & de Souza, O. N. (2005). Molecular dynamics simulation studies of the wild-type, I21V, and I16T mutants of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase (MtInhA) in complex with NADH: toward the understanding of NADH-MtInhA different affinities. *Biophysical journal*, 89(2), 876–884. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.053512>
- Shaw, D. J., Robb, K., Vetter, B. V., Tong, M., Molle, V., Hunt, N. T., & Hoskisson, P. A. (2017). Disruption of key NADH-binding pocket residues of the Mycobacterium tuberculosis MtInhA affects DD-CoA binding ability. *Scientific reports*, 7(1), 4714. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05042-4>
- Sullivan, T. J., Truglio, J. J., Boyne, M. E., Novichenok, P., Zhang, X., Stratton, C. F., Li, H. J., Kaur, T., Amin, A., Johnson, F., Slayden, R. A., Kisker, C., & Tonge, P. J. (2006). High affinity MtInhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *ACS chemical biology*, 1(1), 43–53. <https://doi.org/10.1021/cb0500042>
- Takayama, K., Wang, C., & Besra, G. S. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), 81–101. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.81-101.2005>
- Tarabini, R. F., Timmers, L., Sequeiros-Borja, C. E., & Norberto de Souza, O. (2019). The importance of the quaternary structure to represent conformational ensembles of the major Mycobacterium tuberculosis drug target. *Scientific reports*, 9(1), 13683. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50213-0>
- Teilum, K., Olsen, J. G., & Kragelund, B. B. (2011). Protein stability, flexibility and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1814(8), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.11.005>

- Totrov, M., & Abagyan, R. (2008). Flexible ligand docking to multiple receptor conformations: a practical alternative. *Current opinion in structural biology*, 18(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.004>
- Tsai, C. J., Kumar, S., Ma, B., & Nussinov, R. (1999). Folding funnels, binding funnels, and protein function. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 8(6), 1181–1190. <https://doi.org/10.1110/ps.8.6.1181>
- Vilchèze, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J. C., & Jacobs, W. R., Jr (2000). Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 182(14), 4059–4067. <https://doi.org/10.1128/jb.182.14.4059-4067.2000>
- Vincent, A. T., Nyongesa, S., Morneau, I., Reed, M. B., Tocheva, E. I., & Veyrier, F. J. (2018). The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict from the Past or the Result of Recent Evolution? *Frontiers in microbiology*, 9, 2341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02341>
- Wheeler, P. R., Ratledge, C. (1994). Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis: Pathogenesis, protection, and control* (ed. Bloom BR), pp. 353–385 *American Society for Microbiology*, Washington, DC.
- White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y. M., & Rock (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annual review of biochemistry*, 74, 791–831. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524>
- World Health Organization. (2019). Global tuberculosis report 2019. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/329368>
- Yuan, Y., Lee, R. E., Besra, G. S., Belisle, J. T., & Barry, C. E., 3rd (1995). Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6630–6634. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6630>
- Yuan, Y., Zhu, Y., Crane, D. D., & Barry, C. E., 3rd (1998). The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 29(6), 1449–1458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01026.x>
- Zhang, Y. M., Lu, Y. J., & Rock, C. O. (2004). The reductase steps of the type II fatty acid synthase as antimicrobial targets. *Lipids*, 39(11), 1055–1060. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1330-3>
- Zimhony, O., Vilchèze, C., & Jacobs, W. R., Jr (2004). Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (fasI) gene. *Journal of bacteriology*, 186(13), 4051–4055. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4051-4055.2004>

*“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”*

*“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001”*



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br