



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

---

Estudo da interação da *2-trans*-Enoil-ACP (CoA) Redutase de *Mycobacterium tuberculosis* com o complexo inorgânico Isoniazida-pentacianoferrato por Simulação pela Dinâmica Molecular.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM-PUCRS) como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Autor

André Luciano Pasinato da Costa

Orientador

Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza

Porto Alegre, RS  
03/2008

*A meus pais  
Erico e Salete  
e a minha  
esposa Simone.*

## *Agradecimentos*

- Aos meus pais, que nunca deixarão de ser a minha fonte de inspiração.
- A minha esposa que esteve ao meu lado em todos os momentos.
- Aos meus irmãos Adriana e Claudionir pelo apoio no início de minha carreira.
- Ao meu sócio e colega Fabio Ruviaro Carneiro, pela compreensão, apoio e dedicação durante este período no qual muitas vezes tive de me ausentar de minhas obrigações.
- Ao professor Dr. Osmar Norberto de Souza pela orientação, incentivo e oportunidade de trabalho, o qual me recebeu no Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas e acreditou em minha capacidade.
- A Dra. Evelyn Koeche Schroeder pela incentivo e discussões as quais foram de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos colegas do Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas, pelo incentivo e apoio em todos os momentos. Em especial ao colega Marcio Dorn pela dedicação e desenvolvimento dos códigos para análises dos resultados.
- Aos amigos Eder Pieri Cola e Carolina Menegatti pela acolhida em sua casa para que eu pudesse desenvolver este trabalho.
- Aos amigos que fiz na PUCRS, entre eles: Marcio Dorn, Karina Machado, Ardala Breda e Gustavo Dutra, pelos almoços e desabafos nos momentos difíceis.
- Ao professor e amigo Dr. Alcion Alves Silva que me orientou durante a graduação, pelo apoio e dedicação que foram fundamentais para minha formação.
- A todos os amigos e familiares que, de maneira direta ou indireta, colaboraram para o sucesso desta nova conquista.

## Índice

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Índice	iii
Resumo	iv
Abstract	v
<b>1 - Fundamentação teórica</b>	<b>01</b>
1.1 - O Problema: Tuberculose	01
1.2 - O Tratamento da Tuberculose	02
1.3 - Sistema de Síntese de Ácidos Graxos em MTB	03
1.4 - O Complexo Isoniazida-pentacianoferrato (IPF)	06
1.5 - Desenvolvimento de Fármacos	08
<b>2 - Justificativa e Objetivos</b>	<b>12</b>
2.1 - Justificativa	12
2.2 - Objetivo Geral	13
2.3 - Objetivo Específico	13
<b>3 - Artigo Científico</b>	<b>14</b>
Ligand-induced Conformational Change in 2- <i>trans</i> -enoyl-ACP(CoA) Reductase (InhA) from <i>M. tuberculosis</i> : A Molecular Dynamics Study	14
<b>4 - Considerações Finais</b>	<b>58</b>
4.1 - Testes dos Parâmetros do IPF	58
4.2 - InhA: características estruturais	61
4.3 - Interação IPF-InhA	68
<b>5 - Conclusões</b>	<b>72</b>
5.1 – Perspectivas Futuras	73
<b>6 - Anexos</b>	<b>74</b>
6.1- Parâmetros do IPF	74
6.2- Parâmetros do Campo de Força do IPF	75
6.3 - Arquivos de entrada para as simulações da Dinâmica Molecular	77
<b>7 - Referências</b>	<b>81</b>

## Resumo

A re-emergência da tuberculose é um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em 2006, cerca de 2 bilhões de pessoas, ou um terço da população mundial, foram infectadas com o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), e em 2007 relata que 1,6 milhões de pessoas morreram de tuberculose (TB) no ano de 2005. O surgimento das formas de TB resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) e extensivamente resistente a drogas (XDR-TB), as quais não respondem ao tratamento convencional, colaboram para este crescimento. A Isoniazida (INH, hidrazida do ácido isonicotínico) é uma das drogas sintéticas mais antigas, e seu mecanismo de ação é complexo. Mutações em pelo menos cinco genes diferentes (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, e *ndh*) foram correlacionadas com a resistência a INH. O complexo inorgânico *Isoniazida-pentacianoferrato* (IPF) é o resultado do desenho racional de drogas na tentativa de achar uma alternativa capaz de inibir a InhA. O IPF é capaz de inibir os tipos selvagem e o mutante I21V da InhA, resistente à INH, e esta inativação não requer ativação por KatG. Neste trabalho, realizamos duas simulações por dinâmica molecular do complexo IPF-InhA, utilizando todos os átomos em solução aquosa, com o objetivo de investigar os eventos moleculares relacionados ao modo de interação droga-alvo e suas afinidades. Observamos que o IPF interage fortemente com a InhA e estas interações causam instabilidades na macromolécula devido a perturbação no sítio de ligação do substrato. Estas instabilidades se refletem no longo tempo necessário para a convergência da trajetória. Observamos também que os resíduos Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 e Thr196 são os responsáveis por intermediar a associação IPF-InhA. Concluimos então que o IPF compete diretamente com o NADH pelo seu sítio de ligação e indiretamente com o substrato através da desestabilização do seu sítio de ligação.

## *Abstract*

The reemergence of tuberculosis is a current public health problem. The World Health Organization (WHO) reported in 2006 that 2 billion people, or one-third of the world's total population, are infected with the bacilli *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), and in 2007 reported that 1.6 million people died from TB in 2005. Multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) are forms of TB that does not respond to the standard drug treatment. Isoniazid (INH, isonicotinic acid hydrazide) is one of oldest synthetic antitubercular drugs. The mechanism of action of INH is complex, as mutations in at least five different genes (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, and *ndh*) have been found to correlate with INH resistance. Pentacyano(isoniazid)ferrate II (PIF) is a rational drug design effort to find alternative drugs capable of inhibiting InhA. It was found that PIF inhibit both wild type and isoniazid-resistant I21V mutants of InhA and this inactivation does not require activation by KatG. In this work we report the results of two molecular dynamics simulations of PIF-InhA interaction considering all atoms of this complex in aqueous solution. The results demonstrated that PIF strongly interacts with InhA and these interactions cause macromolecular instabilities due to substrate binding site perturbation. These instabilities are reflected in the long time necessary for trajectory convergence. Besides this, we observed that the residues Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 and Thr196 of InhA are responsible for the PIF-InhA association. So, we conclude that PIF competes directly for the NADH binding site and indirectly with the substrate binding site.

## **1.0 - Fundamentação teórica**

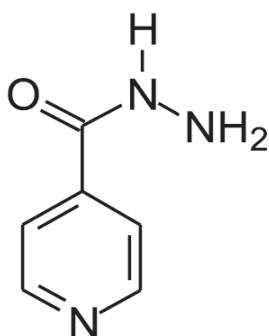
### **1.1 - O Problema: Tuberculose**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em um único ano, cerca de 8,4 milhões de pessoas no mundo desenvolverão a tuberculose (TB), e que quase 2 milhões das mortes são resultado desta doença (1;2). Em 2003, a incidência de TB tendia a diminuir ou estabilizar em cinco das seis regiões delimitadas pela OMS, porém, continua crescendo globalmente a uma taxa de 1,0% ao ano (3;4). Em 2004 ocorreram aproximadamente 9 milhões de novos casos de TB, e 80% deles em apenas 22 países. Já em 2006, a OMS relatou que 2 bilhões de pessoas, aproximadamente um terço da população mundial, foi infectada com o agente etiológico da TB, o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (5). Neste mesmo ano, a OMS constatou que a incidência de TB continuava estável ou em decréscimo em 5 das 6 regiões por ela delimitada. Porém, a taxa de crescimento global ainda é de 0,6% ao ano (6). Já em 2007, foi relatado 1,6 milhões de mortes provocadas pela TB no ano de 2005 (7).

É evidente que existe uma tendência mundial de crescimento da TB, principalmente porque 90% dos casos estão localizados em países subdesenvolvidos (2-5;8). São as pessoas mais pobres dos países subdesenvolvidos que, na maioria das vezes, são afetadas pela TB. A população de um país subdesenvolvido é mais vulnerável à esta doença. Isto se deve, principalmente, às precárias condições de vida e de trabalho. Uma pessoa com TB perde, em média, 20 a 30 % da renda doméstica anual devido à doença, assim estão mergulhados mais profundamente na pobreza como uma consequência da TB (4;5;8). Esta situação por si só justifica a ação urgente para restringir esta epidemia. Examinando o gênero e as dimensões da TB, torna-se importante superar barreiras, para a sua efetiva prevenção, cobertura e tratamento.

## 1.2 - O Tratamento da Tuberculose

O regime de tratamento da TB inclui, diariamente, isoniazida (INH) (Fig.1), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB). O tratamento dura aproximadamente dois meses, seguidos por mais quatro meses de doses diárias de INH e RIF num total de seis meses (9). No entanto, a falta de comprometimento dos pacientes torna muito comum o fracasso do tratamento (10). Como o MTB é um patógeno extremamente contagioso, passando de indivíduo a indivíduo pelo aerossol contaminado por esporos produzido ao tossir, o fracasso do tratamento aumenta a probabilidade da disseminação de cepas de MTB resistente a drogas (11). Sendo a TB uma das principais causas de morte por agentes infecciosos no planeta, e tendo em vista o aumento das taxas de TB resistente a drogas como uma preocupação global, torna-se necessário o desenvolvimento de novas drogas que possibilitem o tratamento da doença em um menor tempo. Estes novos compostos (drogas) devem atuar com efetividade contra cepas resistentes a múltiplas drogas e também para a TB em estado latente (12).



**Fig. 1.** Isoniazida (INH).



Embora o índice de resistência às drogas permaneça estável para INH e RIF (ocorrendo em 6 a 7% para INH e 1% para RIF) em novos casos, internacionalmente, os relatórios de estudos regionais de resistência a drogas, para qualquer agente anti-tuberculose de primeira linha, mostram uma variação de 2 a 37% (média de 10,7%), sendo a resistência para INH a forma mais comum. A resistência é consideravelmente mais alta entre pacientes previamente tratados para TB (média de 23,3%) (12-14). Estas cepas de MTB resistentes a múltiplas drogas colocam novamente a tuberculose como um grande problema de saúde pública mundial.

Muitos determinantes de resistência potencial são também codificados no genoma (12;13;15). Estes incluem, a hidrólise ou modificação de enzimas como a 2-*trans*-Enoil-ACP (CoA) redutase (InhA) (Fig. 2), as  $\beta$ -lactamases e o acetil aminoglicosídeo transferases. O conhecimento deste mecanismo de resistência provê o melhor uso das drogas existentes e facilita a concepção e formulação de novas terapias (16).

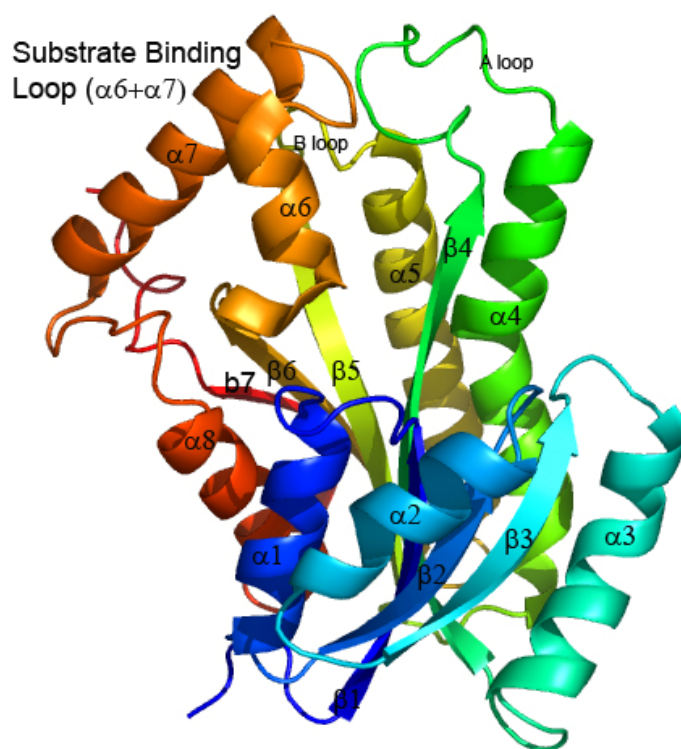
Além das mutações em enzimas alvo, a própria constituição do MTB o torna resistente à penetração de drogas. Este fenômeno ocorre principalmente pela presença de um envelope celular altamente hidrofóbico (17).

### **1.3 - Sistemas de Síntese de Ácidos Graxos em MTB**

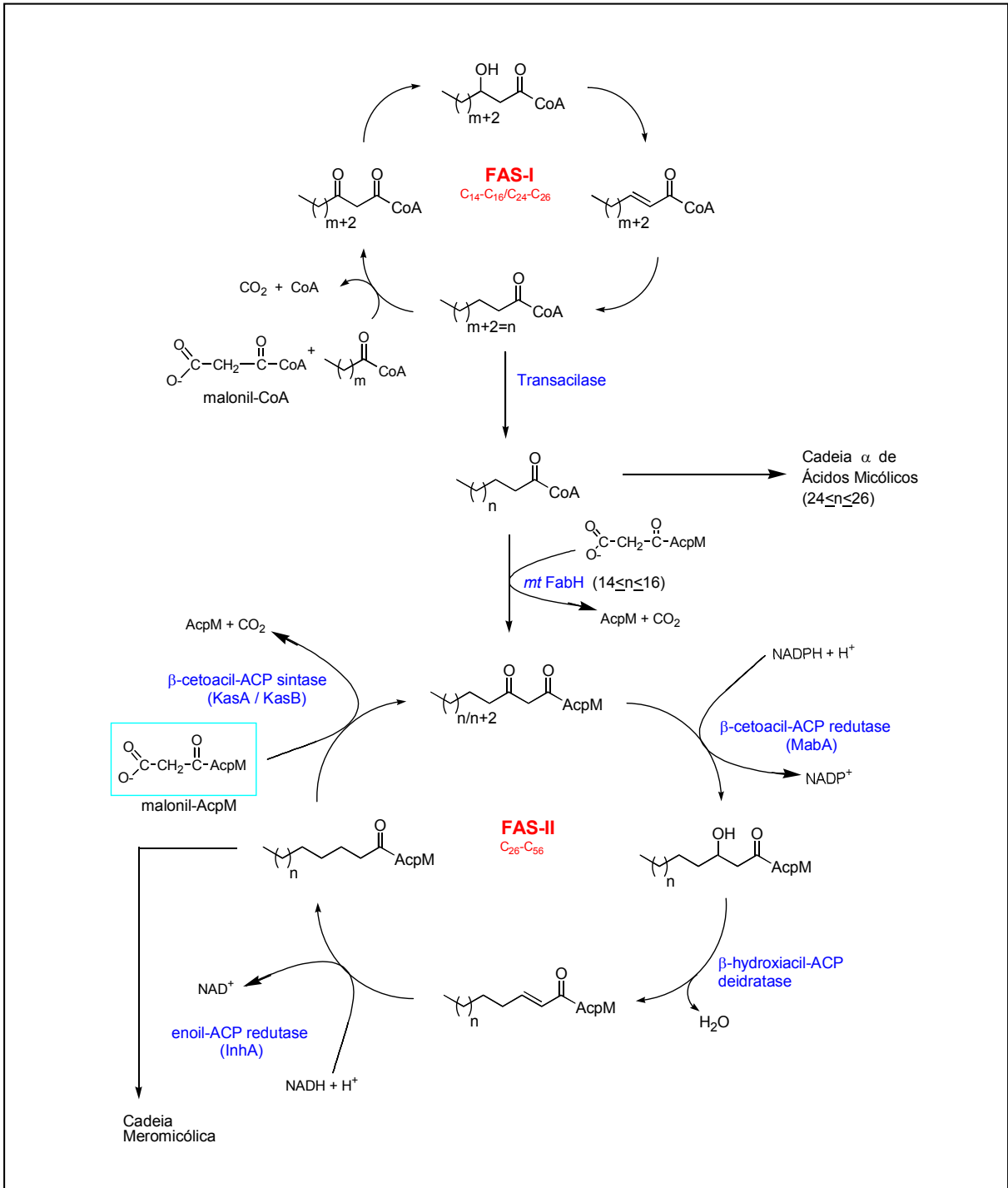
Os sistemas de síntese de ácidos graxos FAS-I e FAS-II (Fig. 3) estão envolvidos na biogênese de ácidos micólicos em MTB, os quais são muito importantes na formação do envelope celular. O sistema enzimático FAS-I é um único polipeptídeo com atividades catalíticas múltiplas que gera precursores de

ácidos graxos que, por sua vez, são alongados por FAZ-II, (18;19). Este único polipeptídeo pode ser o alvo para drogas como a PZA (20).

O sistema FAS-I sintetiza ácidos graxos que são convertidos em FAS-II nos ácidos micólicos, os quais formam metade da massa do envelope celular de MTB (21;22). O FAS-II é um sistema multi-enzimático incapaz de fazer a síntese *de novo* de ácidos graxos. Porém, atua no prolongamento do palmitoil-ACP a ácidos graxos, cujas cadeias variam de 24 a 56 carbonos (18). Os ácidos micólicos são organizados em uma monocamada dentro do envelope celular formando uma barreira de permeabilidade eficiente contra moléculas hidrofílicas. Esta barreira é provavelmente que responde pela alta resistência do MTB a substâncias tóxicas (21;22). Vários componentes diferentes de FAS-II podem ser alvos de drogas, incluindo a InhA e a KasA. Estas enzimas são essenciais na biogênese de ácidos micólicos em MTB (16;23;24).

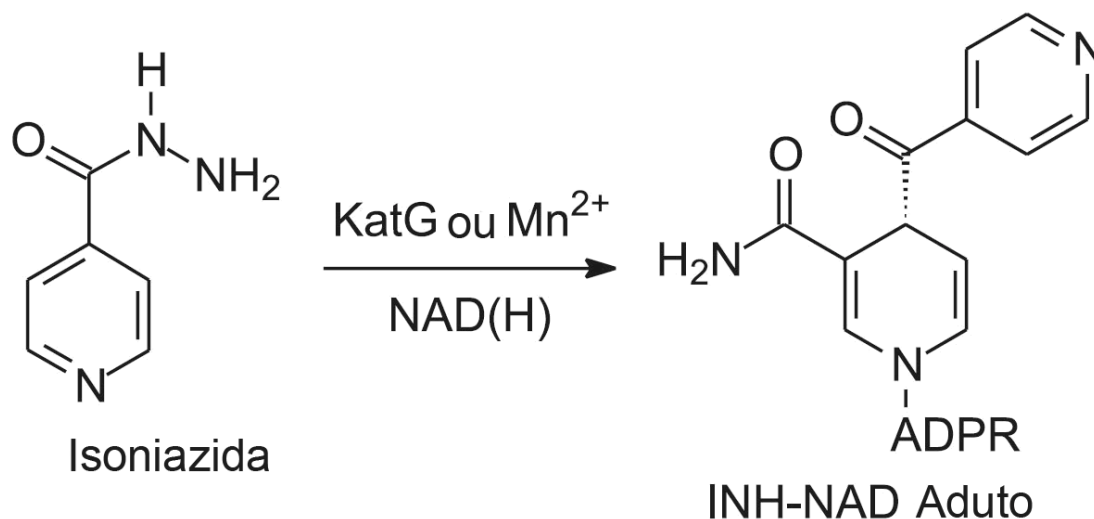


**Fig. 2.** Representação da estrutura secundária do tipo selvagem da InhA, colorido de acordo com a sucessão de estruturas secundárias, do azul (N-terminal) ao vermelho (C-terminal).



**Fig. 3.** Biossíntese de ácidos graxos em *Mycobacterium tuberculosis*. O sistema FAZ-I sintetiza ácidos graxos numa distribuição bimodal de C<sub>16-18</sub> e C<sub>24-28</sub>, que são removidos do complexo enzimático por uma transacilase na forma de acil-CoA de cadeia longa. A enzima mtFabH, que tem especificidade pelos produtos de cadeia menor do sistema FAZ-I, catalisa a condensação desses precursores acil-CoA com o malonil-ACP. O produto é então alongado pelo sistema FAZ-II, resultando em cadeias carbônicas longas precursoras da cadeia meromíclica (C<sub>50-60</sub>) dos ácidos micólicos. Os produtos mais longos do sistema FAZ-I (C<sub>24-26</sub>) são utilizados (provavelmente ligado à CoA) como substrato na formação da cadeia α dos ácidos micólicos. Adaptado de Schroeder *et al.*, 2002. [20]

A INH, uma potente droga de primeira linha e efetiva no tratamento da TB durante os últimos 50 anos, tem como alvo a enzima InhA (Fig.2 e Fig.3) de FAS-II, consistente com a observação de que a INH interfere na biogênese de ácidos micólicos (25-27). Porém, por ser uma pró-droga, a INH deve ser ativada pela enzima KatG de MTB (Fig.4). Uma fração significativa de todos os casos isolados clinicamente é resistente à INH devido a mutações na KatG (13;14;28-33) .

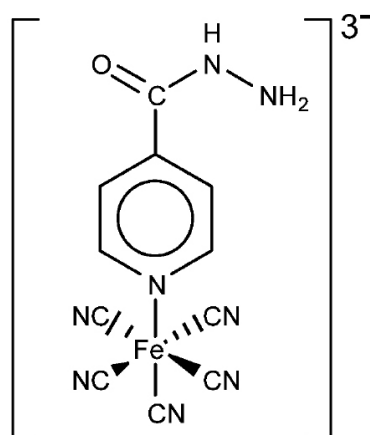


**Fig. 4.** Ativação da pró-droga isoniazida (INH) e formação do aduto covalente com o NAD(H), o qual inibe a atividade da enzima InhA. Adaptado de Rawat, Whitty & Tonge 2003 [27]; Oliveira *et al* 2006.[2]

#### 1.4 - O Complexo Isoniazida-pentacianoferrato (IPF)

A INH tem um mecanismo de ação complexo, o qual envolve a sua conversão pela enzima KatG em intermediários eletrofílicos (34). Apesar de não ser capaz de inibir diretamente a enzima InhA, a ativação da INH pela KatG produz intermediários que são capazes de inibir esta enzima em presença do NADH. Sendo a INH uma das principais drogas para o tratamento da TB e considerando o aumento dos casos de TB resistente a esta, principalmente aquelas provocadas por mutações na enzima KatG (em proximadamente 50% dos casos), nasce a motivação para a investigação de possíveis compostos inibidores que não necessitem de ativação prévia.

Dentro desta abordagem foi proposto o uso de complexos organo-metálicos como o IPF (Fig.5) (Pentacianoferrato com o centro metálico ligado à INH). Este composto é um modelo com boas perspectivas para o desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento dos casos de TB multi-resistente (34).



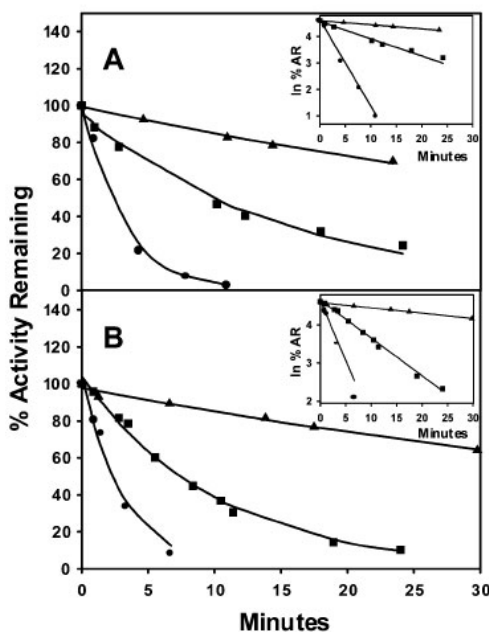
**Fig. 5.** Fórmula estrutural do complexo Isoniazida-pentacianoferrato  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$  adaptado de Oliveira *et al.* 2004. [35]

Testes cinéticos de inativação *in vitro* da enzima InhA, espécie selvagem e mutante I21V, pelo IPF, incubados na ausência de KatG e NADH, indicaram que este processo não requer ativação pela KatG, e que não há qualquer necessidade da presença de NADH.

Como pode ser observado no gráfico (Fig.6), a presença de NADH na solução aumenta o tempo de inativação da enzima, demonstrando que pode haver uma competição entre NADH e IPF pelo sítio de ligação do NADH na InhA (1;34;35). Ensaio cinéticos com o análogo do substrato da enzima InhA, o C16, demonstraram que o IPF também concorre com o C16 pelo seu sítio de ligação.

Estudos computacionais complementares de *docking* do IPF à enzima InhA tipo selvagem demonstraram que este inibidor ocupa, preferencialmente, os sítios de ligação das porções pirofosfato e nicotinamida do NADH dentro de sua cavidade de

ligação (1). Desta forma, o IPF parece ser um análogo do NADH e do substrato C16, concorrendo com ambos pelo seu sítio de ligação, ou se ligando em uma posição intermediária entre estes sítios na enzima. Esforços para a obtenção da estrutura tridimensional (3D) deste complexo formado entre IPF e a InhA podem melhorar o entendimento atual desta interação e auxiliar no desenho de uma nova classe de agentes anti-micobacterianos.



**Fig. 6.** (A) Inativação do tipo selvagem da InhA (3  $\mu$ M) pelo  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{-3}$  (IPF) (100 $\mu$ M): ● sem NADH; ■ com 10  $\mu$ M NADH; ▲ com 100  $\mu$ M NADH. (B) Inativação do mutante I21V da InhA nas mesmas condições descritas na parte A. Adaptado de Oliveira *et al.* 2004. [35]

Além disso, um estudo onde foi observado a variação na fluorescência dos triptofanos da InhA, sugere que o IPF pode provocar alterações conformacionais nesta enzima durante a formação do complexo IPF-InhA (36).

Desta forma, o IPF se apresenta como um candidato promissor ao desenvolvimento de novas drogas anti-tuberculose, representando uma classe distinta de substâncias para o desenvolvimento de novas drogas (1;34;35).

## 1.5 - Desenvolvimento de Drogas

Com a necessidade do desenvolvimento de drogas mais eficazes para o tratamento da TB torna-se necessário o uso de novas técnicas que agilizem o processo de desenvolvimento de medicamentos. A técnica usual para a identificação de novas drogas é a análise laboratorial de vastas bibliotecas de substâncias químicas específicas para um alvo biológico (37). Um método alternativo, conhecido como análise computacional, envolve a utilização de grandes bibliotecas de substâncias químicas para testes virtuais de combinações que complementam alvos de estruturas conhecidas (37).

A abordagem baseada na análise computacional traz vários desafios, os quais incluem a prova das várias conformações de flexibilidade molecular e o cálculo das energias de ligação em um ambiente aquoso. Não obstante, este campo obteve importantes sucessos recentemente: novos ligantes foram preditos baseados nas estruturas de receptores, em vários casos, com taxas de acerto significativamente maior do que com métodos de análise laboratorial (37) .

Mesmo com as limitações atuais, o acesso a análises virtuais fornece um grande número de possíveis novos ligantes, os quais podem ser comprados ou sintetizados, e então testados (38). Para aqueles que podem tolerar as limitações do método, este oferece uma rota prática para descobrir novos ligantes e representa uma nova direção para a pesquisa farmacêutica (37;38).

Um destes métodos de análise computacional é a Simulação por Dinâmica Molecular (DM), a qual pode prover a descrição detalhada dos movimentos individuais de partículas em função do tempo. Assim, pode-se usar a simulação por DM para responder questões específicas sobre as propriedades de um sistema

modelo de maneira mais simples que no sistema experimental disponível (39). Para muitos aspectos da função biomolecular, são estes detalhes que interessam. Porém, experimentos fazem um papel essencial na validação da simulação (39). Comparações entre os resultados das simulações e dados experimentais servem para testar a precisão dos resultados calculados e fornecer critérios para melhorar a metodologia. Outro aspecto significativo das simulações é que, embora os potenciais usados em simulações sejam aproximados, eles são completamente controlados pelo usuário, de forma que a remoção ou alteração de atribuições permite o exame ou verificação de propriedades específicas do sistema em estudo (40).

A simulação por DM de biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios em ambientes nativos, teve avanços significativos devido à viabilidade de campos de força da mecânica molecular confiáveis, proporcionando melhor desenvolvimento da simulação, das metodologias e um razoável tratamento das forças eletrostáticas de longo alcance (41). Com estes métodos, os resultados foram simplesmente além dos campos de força, testando ou exibindo baixa divergência de estruturas experimentais, dando credibilidade estrutural e uma melhor compreensão da fenomenologia em uma variedade de processos (41-43).

Infelizmente, a tecnologia atual de análise a nível molecular não pode produzir uma descrição completa do mundo molecular. Embora técnicas especializadas produzam algumas imagens de estruturas atômicas, questões sobre dinâmica a nível molecular permanecem sem resposta. A simulação por DM permite a resolução de problemas freqüentes que requerem uma compreensão das interações que acontecem a nível molecular. O aumento no número de estudos que usam DM para simular as propriedades de macromoléculas biológicas foi fomentado pela disponibilidade de programas e do poder computacional requerido (40). As primeiras simulações possuíam menos de 10 picos-segundos (10ps). Atualmente as



simulações são freqüentemente 1.000 vezes mais longas (10ns), mas leva um fator de tempo 50 vezes menor para um sistema do mesmo tamanho devido ao uso de computadores mais rápidos (40). Com o aumento do ganho em tempo de simulação, foi possível estudar sistemas maiores e incluir, por exemplo, um ambiente de membrana ou solvente explícito. Além de ser possível executar as simulações por um período de tempo mais longo, o acesso a computadores mais rápidos e sistemas de múltiplos computadores (Clusters) permitiu que simulações fossem executadas com estimativas de erros estatísticos (40). Devido à complexidade dos sistemas e dos diferentes problemas a serem respondidos, programas de simulação por DM como CHARMM (44) e seus descendentes AMBER (45) e GROMOS (46), estão em constante evolução e aprimoramento(40). Além disso, programas de visualização e análise como SwissPDB Viewer(47), PyMol(48), Procheck(49), Promotif(50), Lilgplot (51), Naccess (52) e outros fornecem ferramentas precisas para estudo das estruturas protéicas, ligantes e suas interações. Assim, as aplicações evoluem rapidamente, acompanhando o desenvolvimento das metodologias de simulação (53).

## 2.0 - Justificativa e Objetivos

### 2.1 - Justificativa

O grande aumento no número de novos casos de TB, principalmente aqueles causados por cepas de MTB resistentes a múltiplas drogas, coloca novamente a tuberculose como um grande problema de saúde pública. Decorrente disso surge a imprescindível necessidade do desenvolvimento de drogas mais eficazes para o seu tratamento. O complexo inorgânico IPF representa uma nova classe de compostos para o desenvolvimento de agentes anti-tuberculose porque, além de ter afinidade por um alvo específico, a InhA, ele não necessita de ativação prévia para sua ligação, como ocorre na INH. Sendo assim, é muito importante entendermos os eventos e mecanismos envolvidos na formação do complexo droga-alvo. Este entendimento permitirá aprofundar o nosso conhecimento atual relacionado a este novo complexo.

Com a ausência de dados estruturais sobre a formação do complexo IPF-InhA, a simulação por DM é uma alternativa apropriada para a investigação com maiores detalhes das principais interações entre o IPF e a InhA. Este estudo possibilitará o conhecimento das propriedades dinâmicas deste sistema, contribuindo para a elucidação dos eventos moleculares envolvidos nos mecanismos de ação da droga, podendo comprovar ou não a hipótese levantada por Vasconcelos *et al.* (36), que sugere a ocorrência de alterações conformacionais na enzima durante a formação do complexo IPF-InhA. Juntamente com o grande número de ferramentas computacionais disponíveis para geração e a análise de modelos biológicos, as simulações por DM possibilitam o acompanhamento detalhado dos

movimentos individuais dos átomos em função do tempo, resultando em um modelo ideal para a compreensão dos mecanismos atômicos e moleculares envolvidos na formação deste complexo. Além disso, estudos experimentais são de difícil realização, e muitas vezes não fornecem os detalhes necessários ao entendimento de certos aspectos a nível molecular. Assim, este trabalho propõe uma descrição, através de modelos dinâmicos, da interação InhA-IPF por simulação pelo método da Dinâmica Molecular.

## **2.2 - Objetivo geral**

Estudo por simulação pela DM da interação da InhA (2-*trans*-Enoil-ACP (CoA) Redutase) de *Mycobacterium tuberculosis* com o complexo inorgânico IPF .

## **2.3 - Objetivos específicos**

- 1) Caracterizar as alterações na conformação da estrutura da enzima devido à ligação do IPF;
- 2) Caracterizar as alterações na conformação da molécula do IPF quando ligado ao sítio ativo da enzima;
- 3) Observar os resíduos de aminoácidos determinantes da ligação do inibidor (IPF) à enzima;
- 4) Observar o comportamento dinâmico do IPF no sítio ativo da enzima.

### **3.0 - Artigo Científico**

Conformational Changes in 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) Reductase (InhA) from *M. tuberculosis* induced by an inorganic complex: A Molecular Dynamics Simulation Study

André L. P. da Costa<sup>1,2</sup>, Márcio Dorn<sup>1,3</sup>, Evelyn K. Schroeder<sup>1,4</sup>,  
Chang-Guo Zhan<sup>5</sup> & Osmar Norberto de Souza<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas – LABIO – PUCRS; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM – PUCRS; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência da Computação – PUCRS; <sup>4</sup>Centro de Biotecnologia – UFRGS; <sup>5</sup>Department of Pharmaceutical Sciences – University of Kentucky, KY - USA

\*Corresponding author: Osmar Norberto de Souza. Address: LABIO - Faculdade de Informática – PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 Prédio 32 - Sala 608. Zip Code 90619-900 - Bairro Partenon, Porto Alegre - RS - Brasil. Tel: +55-51-3320-3611 ext. 8608 Fax: +55-51-3320-3621  
e-mail: [osmar.norberto@pucrs.br](mailto:osmar.norberto@pucrs.br)

## Abstract

InhA, the NADH-dependent 2-*trans*-enoyl-ACP reductase enzyme from *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), is involved in the biosynthesis of mycolic acids, the hallmark of mycobacterial cell wall. InhA has been shown to be the primary target of isoniazid (INH), one of oldest synthetic antitubercular drugs. INH is a prodrug which is biologically activated by the MTB catalase-peroxidase KatG enzyme. The activation reaction promotes the formation of an isonicotinyl-NAD adduct which inhibits the InhA enzyme, resulting in reduction of mycolic acid biosynthesis. The INH mechanism of action is complex, as mutations in at least five different genes (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA*, and *ndh*) have been found to correlate with INH resistance. As a result of rational drug design efforts to design alternative drugs capable of inhibiting MTB InhA, the inorganic complex pentacyano(isoniazid)ferrate II (PIF) was developed. PIF was found to inhibit both wild-type and isoniazid-resistant Ile21Val mutants of InhA and this inactivation did not require activation by KatG. Since no three-dimensional structure of the InhA-PIF complex is available to confirm the binding mode and to assess the molecular interactions made with the protein active site residues, in this work we report the results of molecular dynamics simulations of PIF interaction with InhA. We found that PIF interacts strongly with InhA

and causes macromolecular instabilities reflected in the long time necessary for trajectory convergence. The instability caused by PIF binding to InhA is mainly due to perturbations in the substrate binding loop. We also found that residues Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 and Thr196 are responsible for InhA-PIF association and that PIF competes directly for the NADH binding site and indirectly with the substrate binding site.

Keywords: InhA, *Mycobacterium tuberculosis*, FASII, Pentacyano(isoniazid)ferrate II, Molecular Dynamics Simulations.

## Introduction

The 2-*trans*-enoyl-ACP (acyl carrier protein) reductase enzyme (InhA or ENR, EC number: 1.3.1.9) of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is a member of type II dissociated fatty acid biosynthesis system (FASII) in MTB [1,2]. This pathway, consisting of monofunctional enzymes and ACP [3], elongates FAS I acyl fatty acid precursors to produce the long carbon chains (50-60 carbons) [4,5] of the meromycolate branch of mycolic acids, the hallmark of mycobacterial cell wall [6]. InhA, a NADH-dependent reductase enzyme, has specificity for long-chain substrates (12-24 carbons) [7], consistent with its involvement in mycolic acid biosynthesis [1].

InhA has been shown to be the primary target of isoniazid [8]. Isoniazid (INH, isonicotinic acid hydrazide), one of the oldest synthetic antitubercular drugs [9], is a prodrug [10] which is biologically activated by the MTB catalase-peroxidase KatG enzyme [11]. The activation reaction promotes the formation of an isonicotinyl-NAD adduct which inhibits the InhA enzyme, resulting in reduction of mycolic acid biosynthesis [2,12]. Drugs such as INH, ethionamide (ETH), and pyrazinamide (PZA) require activation for activity against MTB. Interestingly, both activated forms of INH and ETH target the InhA enzyme, despite their different activation processes [8,13]. Based on the mechanism of activation proposed for



INH, via electron transfer reaction [14], an alternative to the self-activation route was proposed for designing new drugs for the treatment of wild-type (WT) and INH-resistant tuberculosis, through the nonenzymatic INH activation method that mimic the isonicotinyl-NAD adduct [15]. Efforts to reproduce this mechanism of activation are in progress and new small molecule compounds have been suggested, for example: SQ109 diamine-based [16], alkyl diphenyl ethers [17], pyrrolidine carboxamide analogues [18], and others [19-21]. These compounds are not expected to be activated prior to interacting with its cellular target. Within this approach Basso, Moreira, Santos and collaborators [22-24] have proposed an INH analog that contains a cyanoferrate moiety (pentacyanoferrate(II)) metal center and the INH ligand [22]. This class of compounds constitute a suitable model system for new perspectives of novel drugs development for the treatment of MDR-TB [23].

The small molecule pentacyano(isoniazid)ferrate II (PIF) is the result of a rational drug design effort to find alternative drugs capable of inhibiting InhA [2,22]. PIF was found to inhibit both WT and INH-resistant Ile21Val mutants of InhA and this inactivation does not require activation by KatG [22]. Since crystal structures of InhA-PIF binary complex are not available, we performed computational docking studies to predict the binding mode(s) of PIF in the InhA

active site [23]. For that we used two crystal structures of InhA: the binary complex with the NADH coenzyme (PDB ID: 1ENY) [25] and the ternary complex with NAD<sup>+</sup> and a substrate analog (PDB ID: 1BVR) [26]. We found that PIF preferentially occupies the pyrophosphate and nicotinamide sites in the NAD(H) binding pocket. However, we could not unambiguously assign a unique binding mode due to the distinct InhA active site conformations from the different PDB files. We concluded that the flexibility of both, enzyme and inhibitor, should be taken into account to properly evaluate their interactions and to conform to the mechanism of slow-binding inhibition proposed for PIF based on WT InhA kinetic studies [23]. In a previous molecular dynamics (MD) simulation study of the NADH interaction with WT InhA and the mutants Ile21Val and Ile16Thr [27], both resistant to INH, we showed that InhA is a considerably flexible enzyme, capable of undergoing the conformational changes necessary to accommodate either substrate and inhibitor in an effective manner. Furthermore, we demonstrated that the mutations lead to conformational changes that reduced the affinity of the InhA-NADH complex. These results were soon after confirmed by X-ray crystallographic studies [28]. A recent characterization of PIF binding to MTB InhA, using spectrofluorimetric techniques [24], hinted at the possibility that the quenching in protein fluorescence upon ligand

binding, reported by the amino acid tryptophan (Trp) fluorescence, is due to conformational changes in the protein as previously suggested [23]. The identification of these enzyme conformational changes requires a considerable experimental effort, highlighting the practical value of computer simulations in their prediction. Consequently there is current interest in the prediction of the three-dimensional (3-D) nature of InhA-PIF specificity, how the enzyme binds the inorganic complex, which conformational changes takes place upon binding, the effect of these changes on the Trp residues solvent accessibility, and which amino acid residues are responsible for PIF binding in the enzyme active site. We address these issues using computational methods, including automated molecular docking and MD simulations. MD simulations make possible the detailed analysis of the individual movements of the atoms in the molecules as a function of time, resulting in an ideal model for understanding the atomic and molecular mechanisms involved in the formation of enzyme-ligand complex [29-32].

## **Methods**

### ***The initial structure of the complex***

We obtained the initial structure of WT InhA from the first crystal structure of the InhA-NADH binary complex (PDB ID: 1ENY) determined at 2.2 Å resolution [25]. The optimized structure of PIF and the Cartesian coordinates (x,y,z) of the InhA-PIF complex were taken from our previous automated molecular docking work, with the initial position of PIF in the active site of InhA obtained from cluster 4 of Table 1 and Figure 11e of Oliveira et al. [23]. This cluster was top ranked and contained only one docked conformation. A simple translation and/or rotation could easily reproduce any of the other three top ranked clusters[23].

### ***Force field and charges***

Pentacyano(isoniazid)ferrate II is a new molecule [22] with unknown atomic charges and force field parameters. The partial atomic charges of PIF were determined as described by Oliveira et al. [23], and its force field parameters empirically derived by comparison with similar small molecules [33]. To test these parameters, we run MD simulations of the PIF molecule fully solvated with TIP3P [34] water molecules at a temperature of 298.16 K. The initial cell dimensions containing the solute were 30.401 x 29.770 x 27.680 Å<sup>3</sup> with PIF solvated by a layer of water molecules of at least

10 Å in all orthogonal directions [35]. The test confirmed the PIF force field parameters we developed as adequate to be used in the MD simulation of the InhA-PIF complex.

### ***MD simulations***

The main MD simulation started from the initial structure of InhA with the docked PIF inhibitor. InhA in complex with PIF contains 4037 atoms and a net molecular charge of -6, considering His120 protonated in the crystal structure. Hence, six sodium ions (Na<sup>+</sup>) were added to neutralize the net negative charge density of the complex, which was then immersed in an orthorhombic box containing a total of 10,502 TIP3P water molecules [34]. The simulation cell dimension was 77.725 x 73.328 x 77.345 Å<sup>3</sup> and the complex solvated by a layer of water molecules of at least 10 Å in all orthogonal directions [35]. The simulation cell contained a total of 35,549 atoms. Energy minimization, equilibration and production phases of the MD simulations were performed as described earlier [35,36]. The simulation was computed in a NPT ensemble at 298.16K with the Berendsen temperature coupling [37] and constant pressure of 1 atm, with isotropic molecule-based scaling [37]. The SHAKE algorithm [38] was applied, with a tolerance of 10<sup>-5</sup> Å, to fix all bonds that contained a hydrogen atom, allowing the use of a 2.0 fs time step in the integration of the equations of motion. No extra

restraints were applied after the equilibration phase. Periodic boundary conditions were applied, with electrostatic interactions between non-bonded atoms evaluated by the particle-mesh Ewald (PME) method [36]. The Lennard-Jones interactions were evaluated using a 9.0 Å atom-based cutoff [36]. For each of the first two MD simulations, those of the PIF molecule alone and the InhA-PIF complex, data were collected for 10.0 ns. At 10.0 ns the PIF ligand was removed “on the fly” from the complex and the InhA enzyme was allowed to relax for another 7.0 ns with no reassignment of velocities. Snapshots were collected every 0.5 ps for analysis. All MD simulations were performed with the SANDER module of AMBER 9 [39] using the ff99SB force field [33,40]. The stability of the simulations were analyzed in terms of the convergence of energy components, secondary structure content, solvent accessible surface area (SASA), radius of gyration, and the root mean-square deviation (RMSD) [41] from the initial structure.

All modeling and MD simulations were performed on an Intel Core2 Duo E6700 2.66 GHz, 4MB L2 Cache, and 2GB of RAM. The 17.0 ns InhA-PIF complex and InhA simulations took about 1957 hours of processing time.

### ***Analysis of the MD simulation trajectories***

The MD simulation trajectories were visually monitored with the computer graphics software VMD [42]. Individual 3-D structures were further analyzed with Swiss-PdbView [43] and their illustrations prepared with the PyMOL Molecular Graphics System [44]. The total number of direct hydrogen bonds (H-bonds) between InhA and PIF was calculated with the HBPLUS program [45] using a maximum donor-acceptor atoms distance of 3.4 Å and a minimum angle of 90.0°. We used the program LIGPLOT [46] for plotting H-bonds and non-bonded contacts. PROMOTIF [47] was used to evaluate the InhA secondary structure pattern along the MD simulation trajectories. NACCESS [48] was used to calculate the SASA of the Trp amino acid residues. The RMSD and the radius of gyration were calculated with the Ptraj module of AMBER 9 [39]. Graphics and statistical analyses were performed with Origin 6.1 Scientific Graphing and Analysis Software (Microcal Software, OriginLab, Northampton, MA). We also developed in house Python-based software to automate analysis of the 54,000 snapshots generated by the three MD simulations described in this work. In the analyses, we adopted the PDB [49] numbering scheme for InhA (PDB ID: 1ENY) with the amino acid residues represented by a three-letter code.

## Results and Discussion

### *Tests of the PIF Parameters*

To test the empirically derived PIF force field (FF) parameters, we first performed MD simulations *in vacuum* and in a water environment. The *vacuum* simulation was very stable (data not shown), a result of the quality and suitability of PIF force field parameters. No extraneous energy values and conformations were observed. Fig. 1 shows the RMSD of the coordinates of PIF in water with respect to the initial structure. The all-atoms RMSD fluctuates between 0.5 Å and 2.3 Å, with an average value around  $1.8 \text{ Å} \pm 0.4$ . The observed fluctuations are mainly due to the ability of the ring moiety of PIF to rotate about the N-Fe axis (Fig. 1A). The rigid, pentacyanoferrate moiety of PIF has stable RMSD values during the entire simulation, converged to a value about 0.4 Å. These results demonstrate the stability of the PIF molecule in aqueous solution, validating its FF parameters and showing that this 10.0 ns MD simulation was long enough to capture PIF intrinsic flexibility. In the simulation of the aqueous InhA-PIF complex, PIF movements about the N-Fe axis are restricted by interactions with the amino acids residues in its binding site. As a result the RMSD of complexed PIF fluctuates at a lower range, between 0.5 Å and 1.3 Å, (Fig. 2) whilst



the rather rigid pentacyanoferrate moiety RMSD values converged to 0.4 Å as expected.

#### ***InhA conformational features***

After the warm-up phase of the MD simulation, in the first 120 ps, the enzyme backbone RMSD with respect to the initial structure increases slowly and monotonically to a value close to 1.8 Å about which it remains up to 3.0 ns (Fig. 3). Then it rapidly decreases and stabilizes for another 2.0 ns up to about 5.0 ns. After that period the RMSD stably progresses to higher values until the end of the simulation of the InhA-PIF complex at 10.0 ns, with an average of  $2.4 \pm 0.1$  Å in the interval 9.0-10.0 ns. Because this analysis involves InhA backbone atoms only, the drifting of the RMSD to the higher values observed suggests that some degree of conformational change took place in the enzyme structure during the simulation of the complex. To test whether these changes were caused the presence of PIF, at 10.0 ns PIF and 3 Na<sup>+</sup> ions were removed from the complex and the apoenzyme, in the simulation box, was allowed to relax for another 7.0 ns. During this second trajectory, the enzyme backbone RMSD reached a plateau around  $2.5 \pm 0.1$  Å in the first 4.0 ns, followed by a gradual decrease over the remaining 3.0 ns, stabilizing at  $2.3 \pm 0.1$  Å in the last nanosecond of the trajectory. This

second simulation, of the apoenzyme, further suggested that the conformational changes observed in the enzyme were in fact due to the formation of a tighter InhA-PIF complex during the first simulation (0.0-10.0 ns). These conformational changes involved alteration of the secondary structure pattern of the enzyme as we will describe below. The radius of gyration (Rgyr) (Fig. 4) is also in agreement with the RMSD behavior, showing a sharp transition at around 3.0 ns and a steady oscillatory increase up to 10.0 ns, with an average of  $18.5 \pm 0.1$  Å in the 9.0-10.0 ns interval. After PIF removal, the Rgyr steadily decreased during the last 7.0 ns, reaching a value of  $18.1 \pm 0.1$  Å in the 16.0-17.0 ns interval. All together, these data suggest that the conformational changes observed in the InhA enzyme are caused by PIF tight-binding and that they are reversible upon PIF removal from the complex.

To confirm this hypothesis and to detail the structural nature of the conformational changes, we used PROMOTIF [47] to measure the time dependence of InhA secondary structure (SS) content during the MD simulations (Fig. 5). These analyses suggest a considerable perturbation resulting in conversion of regular SS ( $\alpha$ -helix mainly) to irregular structures (coils) in InhA. These alterations can be seen in the tertiary structure (Fig. 6). Comparing the MD snapshot at 10.0 ns with the initial enzyme structure (Fig. 6a) we

notice that these structural changes mainly occur in the substrate binding loop [26], comprehending helix  $\alpha_6$  and  $\alpha_7$ , and that the overall Rossmann fold [50] of the enzyme remains unchanged. This result is in agreement with the X-ray diffraction studies of Sullivan et al. [17]. These authors identified similar changes in MTB InhA 3-D structure upon binding of alkyl diphenyl ethers or triclosan. Our observations are important since they support the hypothesis that PIF binding to InhA induces a conformational change [24] albeit it is not directly interacting with the substrate binding site. From the initial structure and during the MD simulation the PIF molecule position is stabilized closer to the NADH binding site. This observation is also in agreement with the experimental results by Oliveira et al.[23] which implies that the inhibition mechanism of PIF may involve interaction to both the NADH coenzyme and the substrate binding sites [23]. Our study indicates that this mechanism is plausible since PIF binding to the NADH binding site also perturbs the substrate binding site, which in turn would possibly prevent substrate association with the enzyme. For this reason, the PIF molecule most likely competes with both the coenzyme NADH and the substrate for their respective binding sites.

Experimental data on intrinsic InhA fluorescence indicated that PIF binding to the enzyme active site triggers a conformational change, inducing the formation of a more stable enzyme-inhibitor

complex [24]. This observation is important since protein fluorescence is related to the solvent accessibility of Trp amino acid side-chains [51] and this is a suitable method to study protein conformational changes and interactions with other molecules [51]. To understand and possibly correlate our data with the experimental fluorescence results of the InhA-PIF interaction[24], we identified all Trp residues in InhA and measured their solvent accessible surface area (SASA) in the initial structure and along the MD simulation.

***Changes in SASA of tryptophan residues correlate with the fluorescence spectra of InhA-PIF complex***

MTB InhA enzyme has four Trp residues. Trp160 is located in the A loop, Trp222 in helix  $\alpha 7$ , Trp230 is in the loop between helices  $\alpha 7$  and  $\alpha 8$ , and Trp249 is located in a loop at the C-terminus. As we are simulating the InhA monomer, and the InhA biological unit is a tetramer [8,26], SASA for those Trp residues located in the tetramer interfaces were not realistic (Fig. 7). Examples are Trp249 and Trp160, located in the interfaces of the tetramer subunits. To partially overcome this problem, we built two InhA tetramers models (based on the 1BVR tetramer [26]). One used the initial InhA structure (PDB ID: 1ENY) and the other the MD snapshot at 10.0 ns. Their SASA were calculated with NACCESS [48] and their differences analyzed.

The total SASA for a Trp residue is calculated as described earlier [48]. Trp249 and Trp160, located internally in the tetramer, have the SASA reduced remarkably when compared to the values obtained using the coordinates of the monomer ( $\text{Trp160}_{\text{monomer}} = 53.02 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp249}_{\text{monomer}} = 189.91 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp160}_{\text{tetramer } 0.0 \text{ ns}} = 4.62 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp249}_{\text{tetramer } 0.0 \text{ ns}} = 39.51 \text{ \AA}^2$ ) (Table1). The SASA of Trp222 and Trp230 are closer independently of the form of calculation, ( $\text{Trp222}_{\text{monomer}} = 15.55 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp230}_{\text{monomer}} = 23.18 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp222}_{\text{tetramer } 0.0 \text{ ns}} = 11.33 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp230}_{\text{Tetramer } 0.0 \text{ ns}} = 17.72 \text{ \AA}^2$ ) (Table1). Hence, we conclude that Trp222 and Trp230 residues are the ones related to the changes in the InhA-PIF fluorescence. Table 1 shows the Trp SASA in the tetramers in the initial structure (PDB ID: 1ENY) and at 10.0 ns. The conformational changes affect the SASA of the Trp residues and consequently the fluorescence. Analyzing the data we conclude that the SASA of some Trp is reduced remarkably when the subunits are in the tetramers. Besides, the sum of the total SASA is reduced in the snapshot 10.0 ns as compared to the initial structure, supporting the hypothesis put forward by Vasconcelos et al. [24]. Fig. 8 shows the SASA variation of Trp222 and Trp230 along the 17.0 ns MD trajectory. Although there exists a tendency of the Trp230 SASA to increase during the dynamics trajectory, it is evident that there is a reduction of the SASA for Trp222, which is located in helix  $\alpha 7$ , where

most of the InhA structural changes occur. In addition, Trp222 is the Trp residue with less affected SASA in the tetramer model, and therefore should be the key Trp residue to contribute to the fluorescence analysis. Together, these data corroborate the hypothesis that PIF causes 3-D conformational changes in InhA, thus agreeing with the works of Sullivan et al. [17] and structurally and dynamically proposes an explanation for the experimental studies of Vasconcelos et al. [24].

#### ***PIF-InhA association***

The initial structure of the InhA-PIF complex was taken from our previous automated molecular docking studies, with the initial position of PIF in the active site of InhA obtained from cluster 4 of Table 1 and Figure 11e of Oliveira et al. [23]. In this predicted complex the PIF ligand made 11 non-bonded contacts with InhA. To obtain further insight into the PIF-binding mechanism in InhA we explored their mode of interaction by atomistic MD simulations. Analyses of the InhA-PIF interactions along the simulation identified the residues important for PIF binding. We computed direct H-bonds as well as non-bonded contacts (non-bonded atoms less than or equal 4.0 Å from each other) with LIGPLOT [46]. Tables 2 and 3 show the percentage time a hydrogen bond and a non-bonded

contact, respectively, existed during the whole simulation trajectory. The values indicate that 14 InhA amino acids residues make H-bonds to PIF in at least one snapshot. Residues Gly14, Ile15, Ser20 and Phe41 interact with PIF over 50% of the time. Hence, they are considered as the most important residues for InhA-PIF interaction (Table 2). Except for Phe41, all other residues are located in a loop between helix  $\alpha$ 1 and strand  $\beta$ 1 which originally interacts with the pyrophosphate moiety of NADH. Phe41 interacts with the adenine moiety of NADH. Furthermore, 23 residues make non-bonded contacts with PIF, with Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94, and Thr196 being the most important, interacting in more than 50% of the simulation time. These residues are located in the loop formed between helix  $\alpha$ 1 and strand  $\beta$ 1 (Gly14, Ile15, Ile16, Ser20), in strand  $\beta$ 2 (Gly40, Phe41), in helix  $\alpha$ 2 (Ile47), in strand  $\beta$ 4 (Ser94), and in helix  $\alpha$ 6 (Thr196). It is important to emphasize that these residues, in their majority, are not involved in mutations described until this moment, except for Ser94 [23]. Figs. 9 and 10 show the number of total number of hydrogen bonds and non-bonded contacts between PIF and InhA as a function of the time. During the dynamic trajectory an average of  $5.3 \pm 1.4$  hydrogen bonds are formed between the PIF inhibitor and the InhA enzyme, while the non-bonded contacts rapidly increases in the beginning

(compared to the initial structure) and decrease in the course of the dynamics, changing from 11 to approximately nine. This probably occurs due to the conformational changes observed near and at the substrate binding site (helix  $\alpha_6$  and  $\alpha_7$ ). All these data supports the notion that PIF strongly interacts with the InhA enzyme. The fact that the residues involved in PIF interaction with InhA are not those involved in InhA mutations relate to resistance to INH, except for Ser94, might explain PIF's ability to inhibit both wild type and I21V INH-resistant InhA [22]. In addition to that, PIF association with InhA in its NADH binding site causes a steric hindrance in the coenzyme binding site, introducing a competition between NADH and PIF for the same binding site, as well as perturbing the substrate binding site, impeding its proper binding and thus contributing to the inhibition of the reaction catalyzed by this enzyme.

## **Conclusion**

There still is no 3-D structure of the InhA-PIF binary complex to confirm the binding mode and to assess the molecular interactions made with the protein active site residues. While X-ray crystallography and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) are powerful and the preferred techniques to determine the 3-D structure



of enzymes and their complexes, it not always possible to obtain single crystals or NMR solution of macromolecular complexes. Meanwhile, alternative, computational methods, such as molecular docking and fully solvated, all-atom MD simulations of the wild-type InhA enzyme in complex with PIF, can provide comparable and useful information to help elucidate the molecular nature of InhA inhibition by the inorganic PIF ligand. In this work, this approach has provided important insights about the InhA residues that interact with the inorganic PIF ligand, the nature of these interactions, and details of the conformational changes undergone by InhA upon PIF binding.

The inorganic PIF compound appears to be a promising candidate to further antitubercular drug development and may represent a new class of lead compounds since it needs no activation by KatG or other enzyme and no need for the formation of any kind of adduct with the cofactor NADH to bind to its molecular target, the *M. tuberculosis* InhA [22].

We conclude that PIF strongly interacts with InhA and that these interactions cause macromolecular instabilities reflected in the long time necessary for trajectory convergence. The instability caused by the PIF interaction with InhA is due to perturbation of the substrate binding site. We also found that residues Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 and Thr196 are responsible

for InhA-PIF association and that PIF competes directly for the NADH binding site and indirectly with the substrate binding site. Although these results must be experimentally confirmed, we have already been able to correlate the changes in the SASAs of the Trp residues with the recent spectrofluorimetric investigation of the InhA-PIF complex [23,24] and confirm their suggestion that the changes in fluorescence were due to InhA conformational changes upon PIF binding. Finally, molecular docking and MD simulations can help elucidate the mode of binding of ligands, or prospective lead compounds, to their target protein and thus facilitate the process of drug design and development to help find alternative treatment for tuberculosis.

### **Acknowledgments**

This project was supported by grants from CAPES, FAPERGS and CNPq to ONS. ALPC was partially supported by a M.Sc. scholarship from PUCRS. ONS is a CNPq Research Fellow.

## Reference

- 1 Takayama K, Qureshi N. *The Mycobacteria: a Sourcebook*. Kubica, G.P. and Wayne, L.G.; Eds ed. 1982.
- 2 Schroeder EK, de Souza ON, Santos DS, et al. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotech* 2002;**3**:197-225.
- 3 Schaeffer ML, Agnihotri G, Volker C, et al. Purification and Biochemical Characterization of the Mycobacterium tuberculosis beta -Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthases KasA and KasB. *J Biol Chem* 2001 Dec 7;**276**(50):47029-37.
- 4 Ratledge C. *The Biology of Mycobacteria*. Academic Press, San Diego ed. 1982.
- 5 Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, et al. Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis {beta}-Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Science* 1998 Jun 5;**280**(5369):1607-10.
- 6 Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* 1997 Dec;**1**(4):579-88.
- 7 Quemard A, Sacchettini JC, Dessen A, et al. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* 1995 Jul 4;**34**(26):8235-41.
- 8 Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994 Jan 14;**263**(5144):227-30.
- 9 Lavender C, Globan M, Sievers A, et al. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Oct 1;**49**(10):4068-74.
- 10 Johnsson K, King DS, Schultz PG. Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis. *J Am Chem Soc* 1995 May 3;**117**(17):5009-10.
- 11 Zhang Y, Heym B, Allen B, et al. The catalase[mdash]peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature* 1992 Aug 13;**358**(6387):591-3.
- 12 Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, et al. Molecular Analysis of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from England and Wales Reveals the Phylogenetic Significance of the ahpC -46A Polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Apr 1;**49**(4):1455-64.
- 13 Vilcheze C, Wang F, Arai M, et al. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* inhA resolves the target of isoniazid. *Nat Med* 2006 Sep;**12**(9):1027-9.

- 14 DeBarber AE, Mdluli K, Bosman M, et al. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 2000 Aug 15;**97**(17):9677-82.
- 15 Michel Nguyena, Annaïk Quemard, Hédia Marrakchi, et al. The nonenzymatic activation of isoniazid by Mn<sup>III</sup>-pyrophosphate in the presence of NADH produces the inhibition of the *enoyl-ACP* reductase InhA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* 2001 Jan 1;**4**(1):35-40.
- 16 Jia L, Tomaszewski JE, Hanrahan C, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br J Pharmacol* 2004 Dec 6;**144**(1):80-7.
- 17 Sullivan TJ, Truglio JJ, Boyne ME, et al. High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* 2006 Feb 17;**1**(1):43-53.
- 18 He X, Alian A, Ortiz de Montellano PR. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007 Nov 1;**15**(21):6649-58.
- 19 Kuo MR, Morbidoni HR, Alland D, et al. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of *Enoyl Reductase*: COMPOUND ACTIVITY AND STRUCTURAL DATA. *J Biol Chem* 2003 May 30;**278**(23):20851-9.
- 20 Zhang Y, Post-Martens K, Denkin S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discovery Today* 2006 Jan;**11**(1-2):21-7.
- 21 Wang F, Langley R, Gulsten G, et al. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* 2007 Jan 16;jem.
- 22 Oliveira JS, Souza EHS, Basso LA, et al. An inorganic iron complex that inhibits *wild-type* and an isoniazid-resistant mutant *2-trans-enoyl-ACP (CoA)* reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Commun* 2004;312-3.
- 23 Oliveira JS, Souza EHS, Souza ON, et al. Slow-Onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex Pp. *Current Pharmaceutical Design* 2006;**12**(19):2409-24.
- 24 Vasconcelos IB, E.Meyerb, F.A.M.Salesb, et al. The Mode of Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Wild-Type and Isoniazid-Resistant *2-Trans-Enoyl-ACP(CoA) Reductase* Enzymes by An Inorganic Complex. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 2008;**7**.
- 25 Dessen A, Quemard A, Blanchard JS, et al. Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1995 Mar 17;**267**(5204):1638-41.

- 26 Rozwarski DA, Vilcheze C, Sugantino M, et al. Crystal Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD<sup>+</sup> and a C16 Fatty Acyl Substrate. *J Biol Chem* 1999 May 28;**274**(22):15582-9.
- 27 Schroeder EK, Basso LA, Santos DS, et al. Molecular Dynamics Simulation Studies of the *Wild-Type*, *I21V*, and *I16T* Mutants of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase (InhA) in Complex with NADH: Toward the Understanding of NADH-InhA Different Affinities. *Biophys J* 2005 Aug 1;**89**(2):876-84.
- 28 Oliveira JS, Pereira JH, Canduri F, et al. Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to *Wild-type* and Isoniazid-resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology* 2006 Jun 9;**359**(3):646-66.
- 29 Cheatham ITE, Brooks BR. Recent advances in molecular dynamics simulation towards the realistic representation of biomolecules in solution. 99 ed. 1998. p. 279-88.
- 30 Karplus M, MacCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *nature structural biology* 2002 Sep;**9**(9):646-52.
- 31 Karplus M, Kuriyan J. Chemical Theory and Computation Special Feature: Molecular dynamics and protein function. *PNAS* 2005 May 10;**102**(19):6679-85.
- 32 Nyarady Z, Czompolly T, Bosze S, et al. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Molecular Immunology* 2006 Mar;**43**(7):830-8.
- 33 Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5179-5197. *J Am Chem Soc* 1996 Mar 6;**118**(9):2309.
- 34 Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 1983 Jul 15;**79**(2):926-35.
- 35 de Souza ON, Ornstein RL. Effect of periodic box size on aqueous molecular dynamics simulation of a DNA dodecamer with particle-mesh Ewald method. *Biophys J* 1997 Jun 1;**72**(6):2395-7.
- 36 Norberto de Souza O, R.L.Ornstein. Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to standard cutoff model. *J Biomol Struct Dyn* 1999;**16**:1205-18.
- 37 Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984 Oct 15;**81**(8):3684-90.

- 38 Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* 1977;**23**:327-41.
- 39 D.A.Case, T.A.Darden, T.E.Cheatham, et al. AMBER 9. *University of California, San Francisco* 2006.
- 40 Roe DR, Okur A, Wickstrom L, et al. Secondary Structure Bias in Generalized Born Solvent Models: Comparison of Conformational Ensembles and Free Energy of Solvent Polarization from Explicit and Implicit Solvation. *J Phys Chem B* 2007 Feb 22;**111**(7):1846-57.
- 41 Maiorov VN, Crippen GM. Significance of Root-Mean-Square Deviation in Comparing Three-dimensional Structures of Globular Proteins. *Journal of Molecular Biology* 1994 Jan 13;**235**(2):625-34.
- 42 Humphrey WD, A.and Schulten K. VMD -Visual Molecular Dynamics. *J Molecular Graphics* 1996;**14**:33-8.
- 43 Guex N&PMC. SWISS\_MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;**18**:2714-23.
- 44 DeLano WL. *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2002.
- 45 I.K.McDonald, J.M.Thornton. Satisfying Hydrogen Bonding Potential in Proteins. *JMB* 1994;**238**:777-93.
- 46 LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. [computer program]. *Prot. Eng.*, 8, 127-134; 1995.
- 47 PROMOTIF-A program to identify and analyze structural motifs in proteins [computer program]. *Protein Science*; 1996.
- 48 Naccess - accessibility calculations [computer program]. *J.Mol.Biol.*220,507-530; 1991.
- 49 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. *Nucl Acids Res* 2000 Jan 1;**28**(1):235-42.
- 50 Rossmann MG, Liljas A, Branden C-I, et al. Evolutionary and structural relationships among dehydrogenases. *Enzymes* 1975;**11A**:61-102.
- 51 Chen Y, Barkley MD. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins. *Biochemistry* 1998 Jun 24;**37**:9976-82.

Table 1. Trp residues Solvent Accessible Surface Area (SASA) analysis. The Trp SASA (in Å<sup>2</sup>) for each monomer in the tetramer built from the experimental initial protein structure (PDB ID: 1ENY) and the snapshot at 10.0 ns.

Subunit	Trp	Tetramer PDB ID: 1ENY	Tetramer Snapshot at 10.0 ns
A	160	4.62	8.64
A	222	11.33	3.87
A	230	17.72	21.43
A	249	39.51	12.66
B	160	4.63	8.51
B	222	11.33	5.19
B	230	17.73	21.81
B	249	39.51	13.32
C	160	4.62	8.47
C	222	11.33	4.45
C	230	17.72	21.44
C	249	39.51	13.53
D	160	4.63	9.07
D	222	11.32	3.75
D	230	17.72	22.03
D	249	39.51	12.28

Table 2. Hydrogen bonds analysis. Amino acids residues H-bonded to PIF along the 10.0 ns MD simulation expressed as a percentage (%) time.

Amino acids in hydrogen bonds with PIF	Time (%)
Gly14	61,57
Ile15	84,40
Ile16	0,03
Thr17	0,40
Ser20	97,43
Ile21	0,45
Ala22	11,54
Phe41	70,69
Arg43	40,29
Ser94	6,26
Gly96	2,16
Thr196	48,44
Leu197	14,57
Ala198	20,31



Table 3. Non-bonded contacts analysis. Amino acids residues making non-bonded contacts to PIF along the 10.0 ns MD simulation expressed as a percentage (%) time.

Amino acids in non-bonded contacts with PIF	Time (%)
Ser13	0,02
Gly14	96,00
Ile15	99,02
Ile16	99,64
Thr17	3,33
Ser19	0,03
Ser20	99,08
Ile21	36,22
Ala22	37,74
Gly40	85,47
Phe41	100,00
Asp42	10,95
Arg43	48,88
Ile47	96,55
Ser94	78,73
Ile95	15,41
Gly96	8,90
Phe97	0,37
Met147	2,91
Ile194	0,01
Thr196	68,77
Leu197	37,87
Ala198	34,01

## Captions to figures

Fig. 1. The 3-D structure of pentacyano(isoniazid)ferrate II (PIF) molecule (A). RMSD as a function of time for (B) the whole PIF molecule (black) and (C) the penta(cyano)ferrate moiety only (grey).

Fig. 2. RMSD of (A) the whole PIF molecule as a function of time in the PIF-InhA complex (black) and (B) the penta(cyano)ferrate moiety only (grey).

Fig. 3. RMSD of InhA backbone atoms ( $C\alpha$ , C, N, O) with respect to the initial, crystallographic structure (PDB ID: 1ENY) along the 17.0 ns MD simulation trajectory. The vertical dotted line at 10.0 ns indicates the time at which the PIF molecule was removed on-the-fly from the PIF-InhA complex.

Fig. 4. The radius of gyration of InhA as a function of time. The vertical dotted line at 10.0 ns indicates the time at which the PIF molecule was removed on-the-fly from the InhA-PIF complex. The horizontal gray line indicates the radius of gyration for the initial, crystallographic structure (PDB ID: 1ENY).

Fig. 5. InhA secondary structure content (% of the total) as a function of time along the MD simulation. The vertical dotted line at 10.0 ns indicates the time at which the PIF molecule was removed on-the-fly from the PIF-InhA complex. (A) percentage of irregular structures and coils, (B) the initial percentage value for the irregular structures and coils, (C) percentage of  $\alpha$ -helix, (D) percentage of  $\beta$ -strand, and (E) percentage of  $3_{10}$ -helix.

Fig. 6. Ribbon representation of the tertiary structure of the InhA-PIF complex (grey) and their interactions calculated with LIGPLOT. (A) and (C) The initial structure and (B) and (D) the snapshot at 10.0ns. The InhA motifs interacting with the inorganic PIF molecule (red stick model) are highlighted in different colors. The substrate binding loop ( $\alpha 6 + \alpha 7$ ) is orange, the A-Loop is magenta, and the B-loop is cyan. In the structure at 10.0 ns we observe a significant perturbation of the substrate binding site ( $\alpha 6 + \alpha 7$ ) and some disorder in helix  $\alpha 2$ . In the initial structure PIF makes 11 non-bonded contacts and no H-bond. At the end of 10.0 ns only five non-bonded contacts are observed together with five H-bonds.

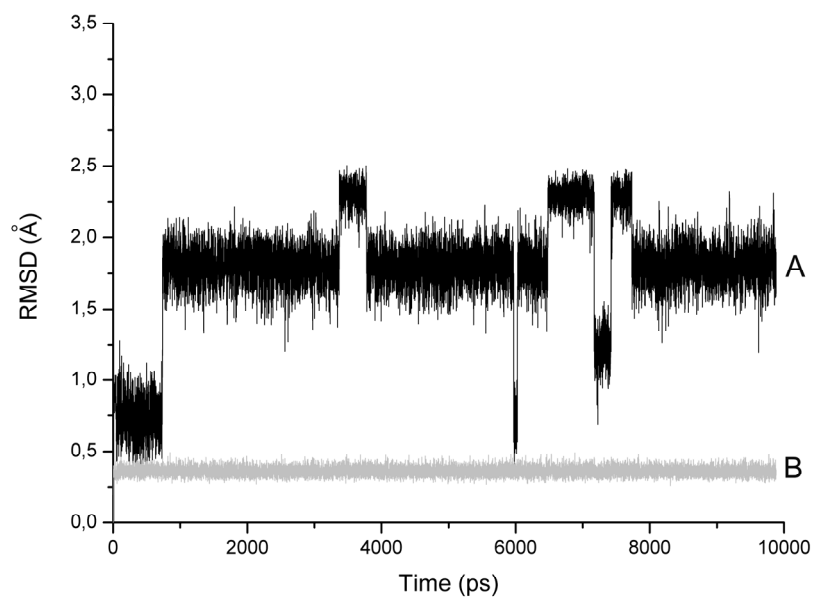
Fig. 7. Molecular surface representation of the InhA tetramer (transparent gray) built from the initial structure (PDB ID: 1ENY). The

ribbon representation of the monomers is colored orange. The Trp residues are represented by the van der Waals spheres colored in magenta.

Fig. 8. The solvent accessible surface area (SASA) for (A) Trp230 and (B) Trp222. The horizontal lines show the SASA values in the initial structure.

Fig. 9. Number of InhA-PIF hydrogen bonds as a function of time. The value for the initial structure is zero.

Fig. 10. Number InhA-PIF non-bonded contacts as a function of time (B). The horizontal grey line (A) shows the number of non-bonded contact in the initial structure.



**Fig. 1.**

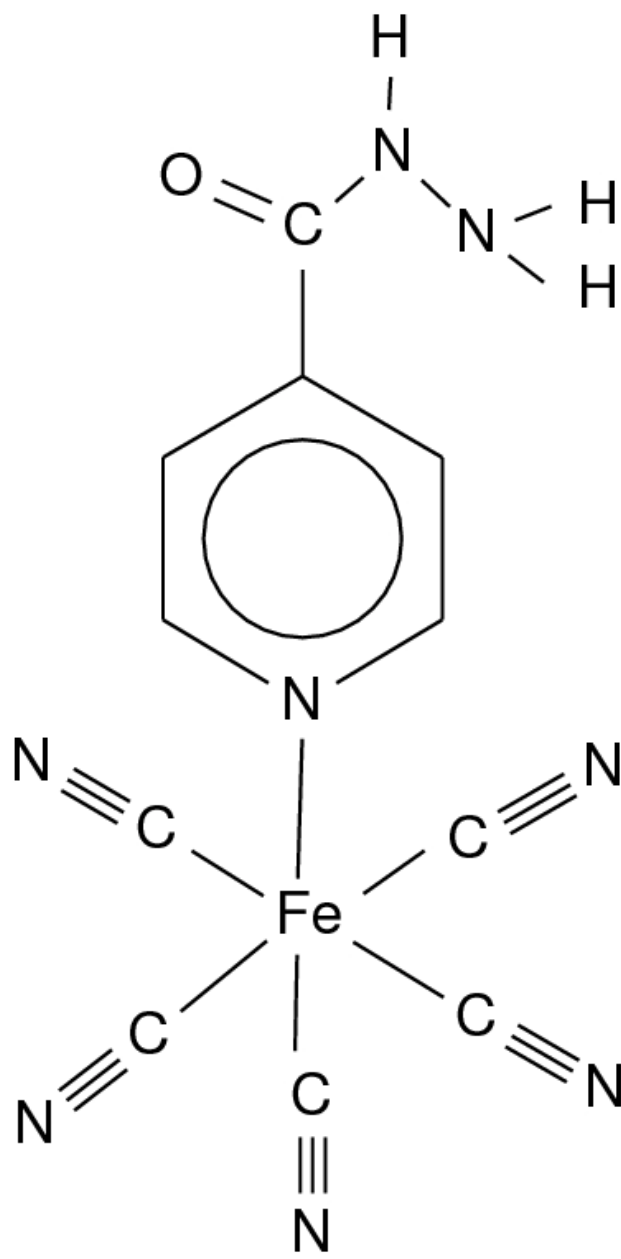
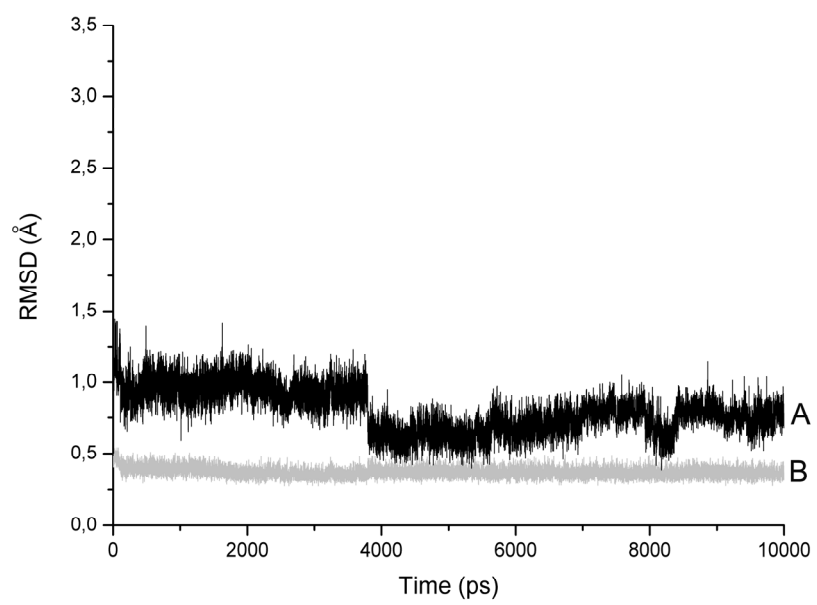
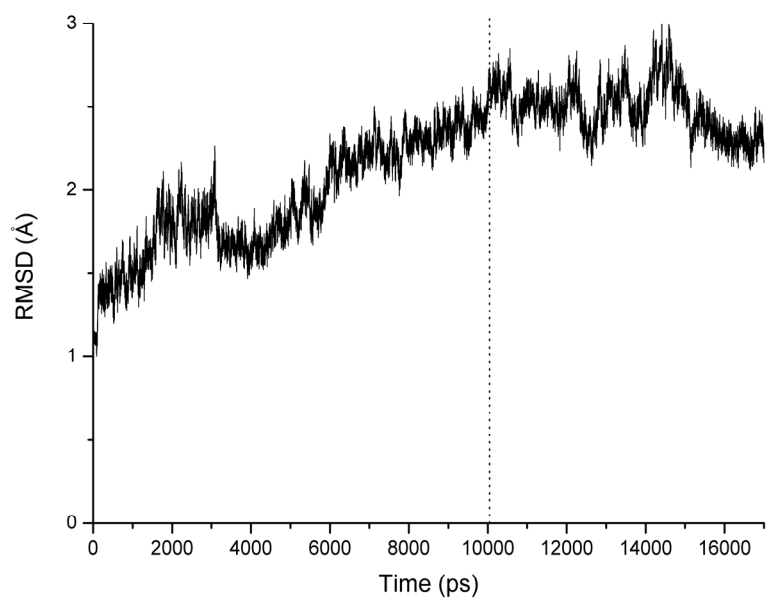


Fig. 1a.

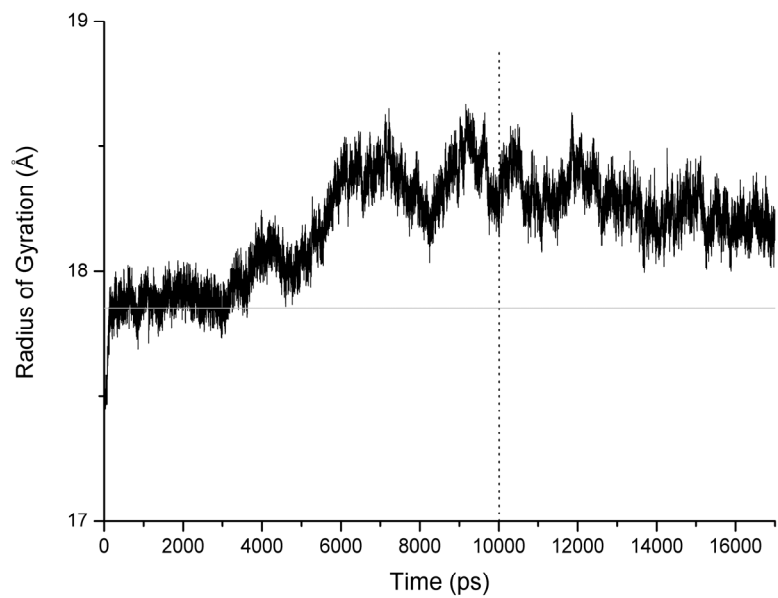


**Fig. 2.**

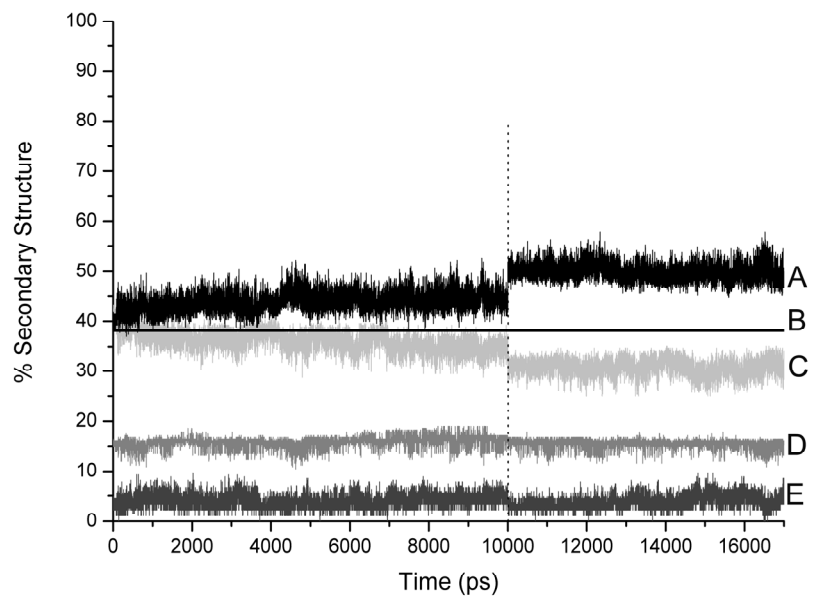


**Fig. 3.**

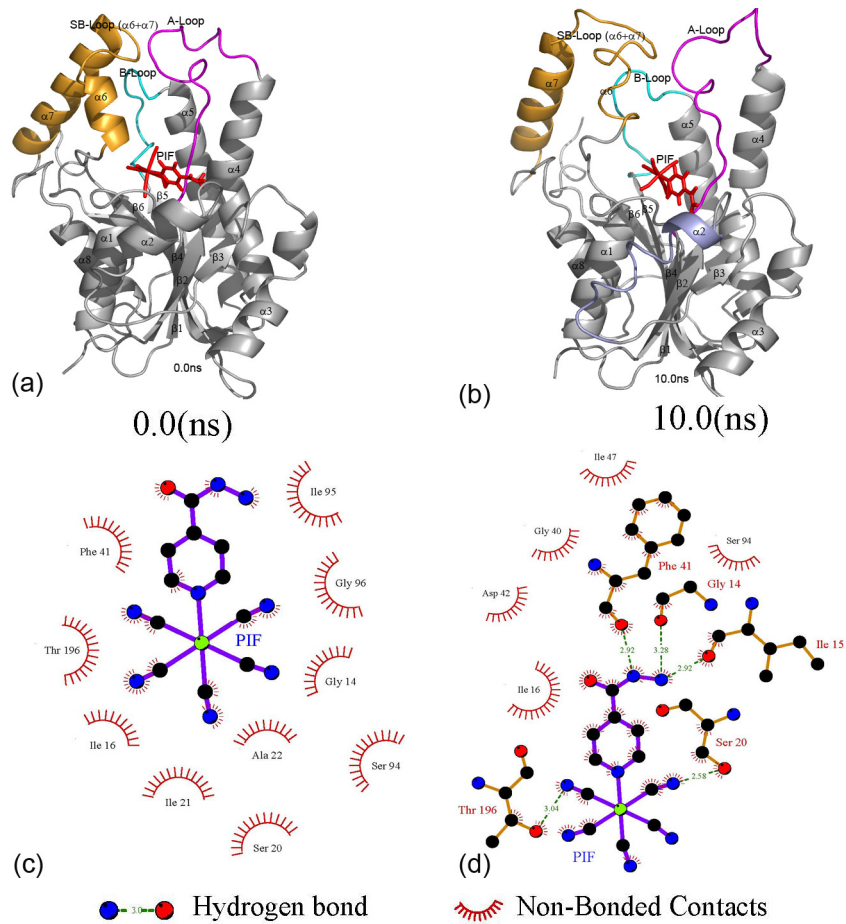




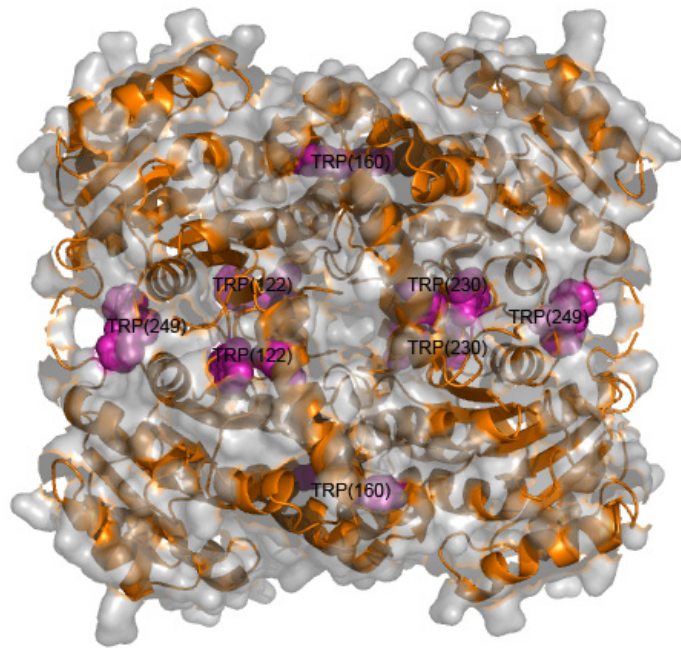
**Fig. 4.**



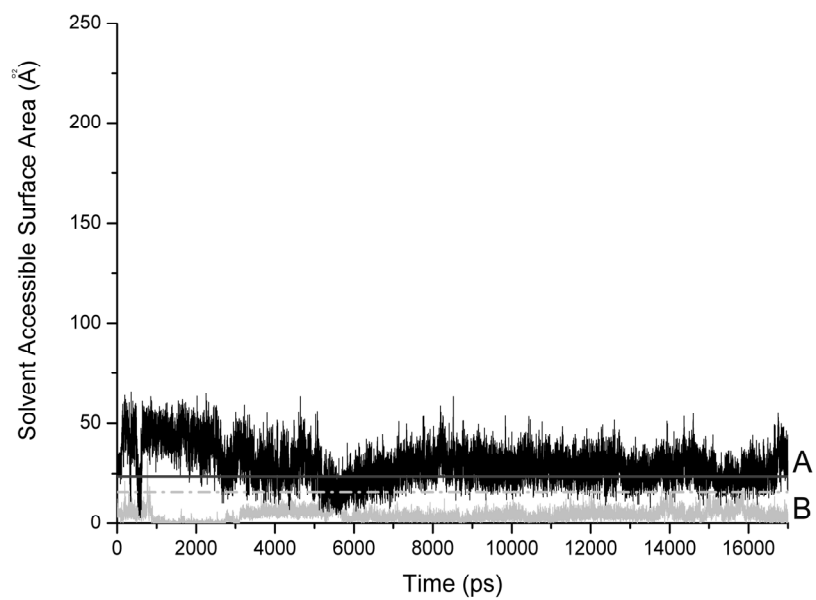
**Fig. 5.**



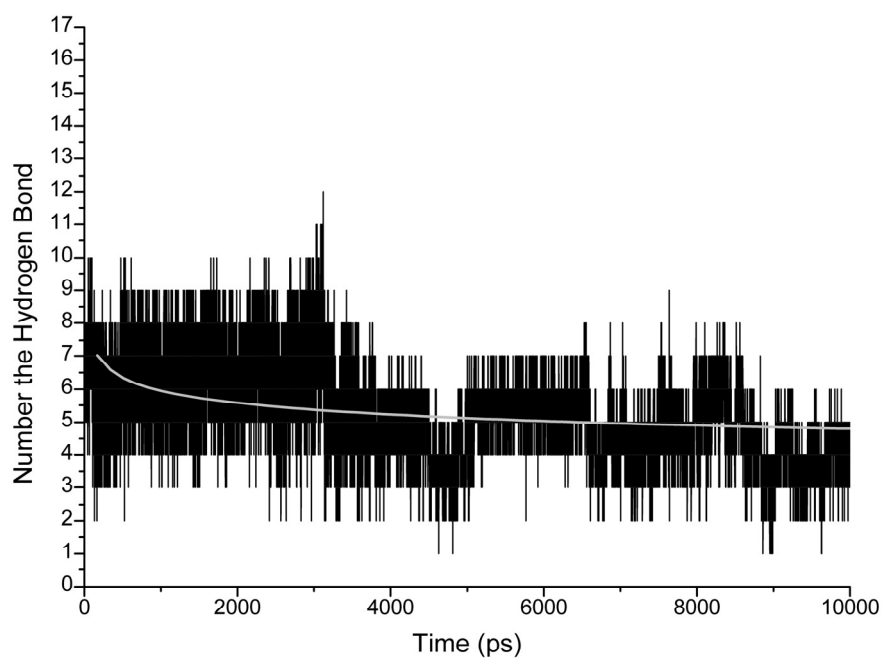
**Fig. 6.**



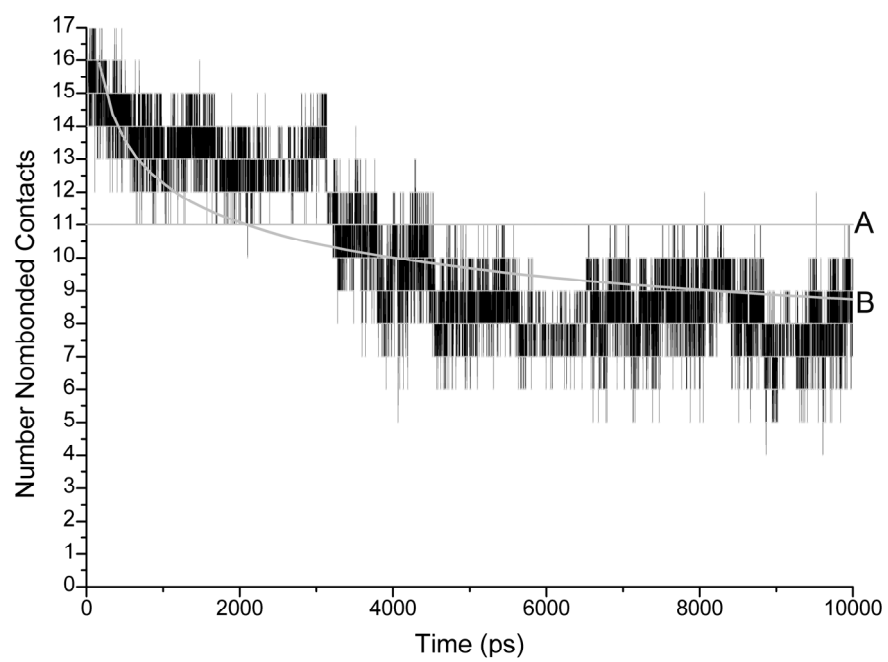
**Fig. 7.**



**Fig. 8.**



**Fig. 9.**



**Fig.10.**

## 4.0 - Considerações Finais

O trabalho aqui apresentado consiste em um estudo via simulação por DM do complexo InhA-IPF. O objetivo foi analisar a ligação do IPF à enzima InhA espécie selvagem e obter informações importantes a cerca da interação ligante-receptor neste sistema.

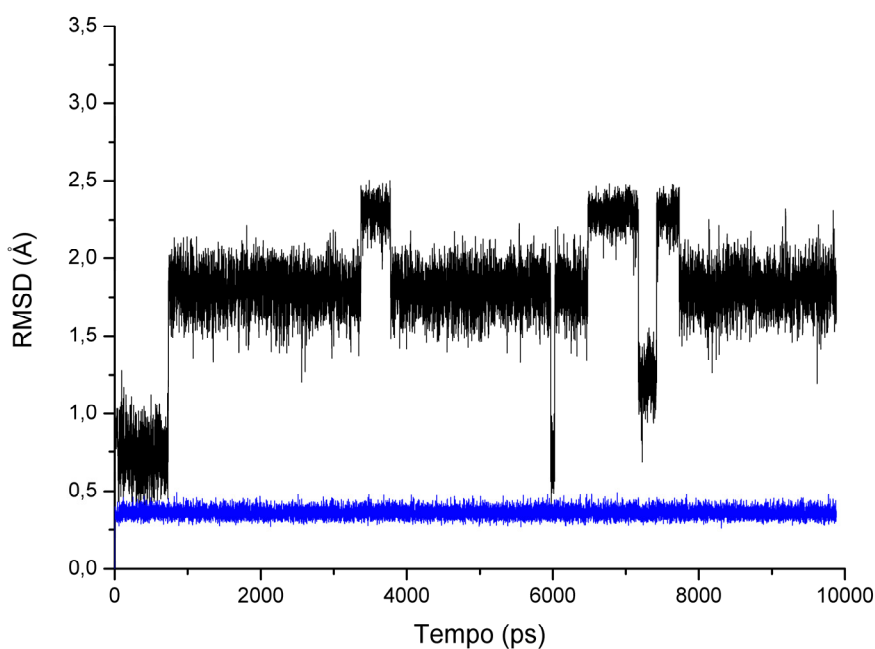
Embora a resistência á INH resulte predominantemente de mutações na enzima KatG (54), compostos baseados nesta molécula e que não requeiram ativação prévia deveriam ser efetivos contra a maioria das cepas mutantes (INH-resistentes) de MTB (55;56). Embora o mecanismo de ação da INH seja indubitavelmente complexo (19), há evidências que a InhA é alvo para a INH (57). Usando técnicas de desenho de drogas baseado na estrutura do inibidor, foi proposto um análogo da INH, o IPF (34). Este novo composto provou inibir a enzima InhA de MTB experimentalmente (34). Como não existe nenhum dado estrutural da associação do IPF com a InhA, neste trabalho foi realizado um estudo através de simulação por DM desta interação (IPF-InhA).

### 4.1- Testes dos Parâmetros do IPF

Para testar os parâmetros do IPF, derivados empiricamente, inicialmente executamos uma simulação por dinâmica molecular somente do IPF em ambiente aquoso. O RMSD entre a estrutura inicial do IPF e as estruturas instantâneas geradas pela dinâmica molecular foi calculado para avaliar a qualidade dos parâmetros desenvolvidos para o campo de força (Fig.7, Anexo 6.2). Para a molécula do IPF, o RMSD flutua entre 0 – 2,3 Å. Quando avaliamos apenas a porção pentaciano do IPF, o RMSD flutua entre 0 – 0,4 Å, demonstrando a estabilidade da molécula do IPF em solução aquosa e assim validando os parâmetros do campo de força.

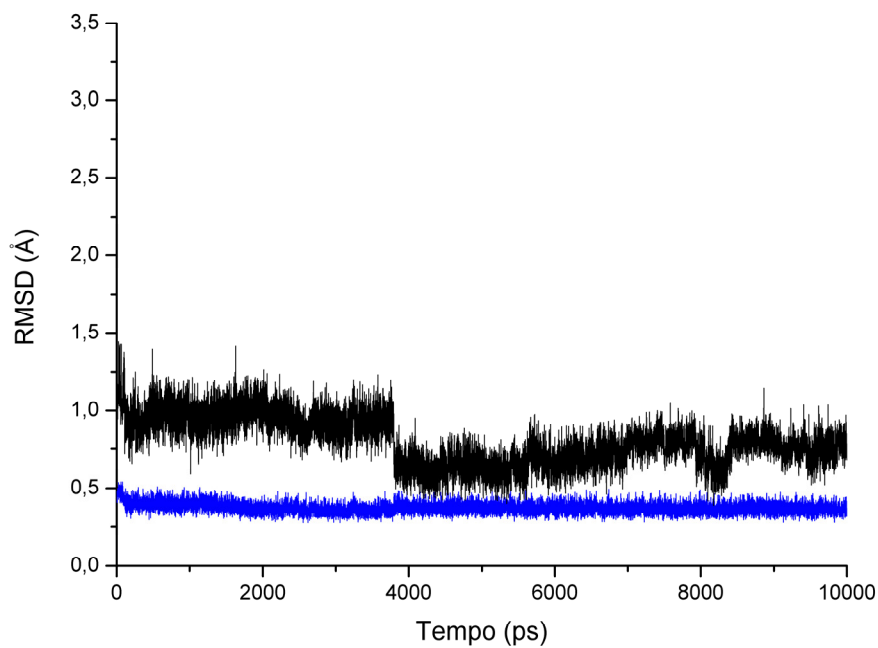


Enquanto livre em solução, a molécula do IPF pode girar livremente através do eixo (N - Fe), sendo essa rotação refletida no valor do RMSD (Fig.7).

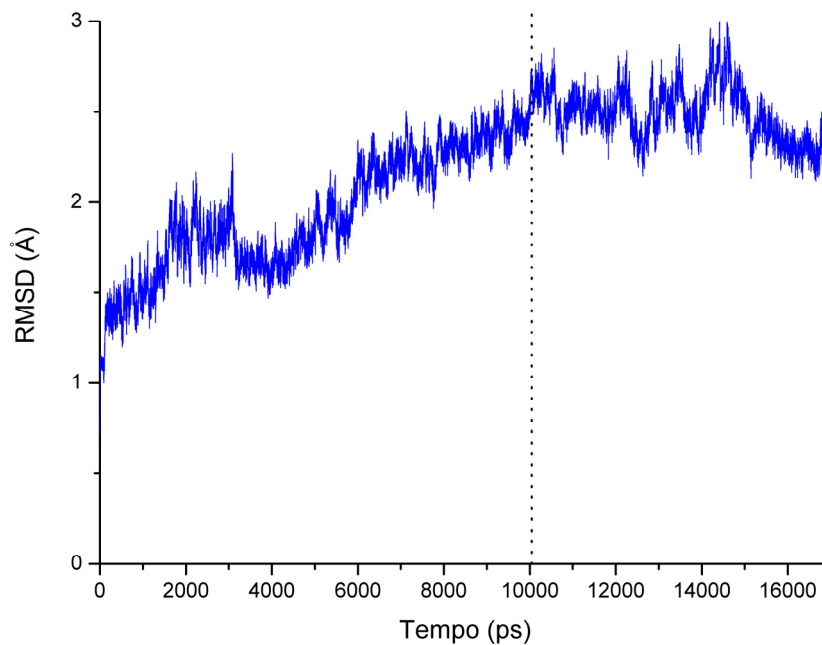


**Fig. 7.** Variação do RMSD, em função do tempo, da molécula de IPF em solução aquosa. Em preto RMSD do IPF. Em azul, RMSD somente da porção pentaciano do IPF.

Quando complexado à enzima InhA, este movimento de rotação sobre o eixo (N-Fe) é restringido pelas interações com os aminoácidos do sítio ativo. Então, o RMSD do IPF apresenta uma flutuação mais baixa, entre 0 e 1,3Å (Fig.8). Nesta situação, o RMSD da porção pentaciano flutua entre 0 – 0,4 Å, apresentando o mesmo valor obtido em solução aquosa. Este resultado demonstra a alta estabilidade dos parâmetros propostos.



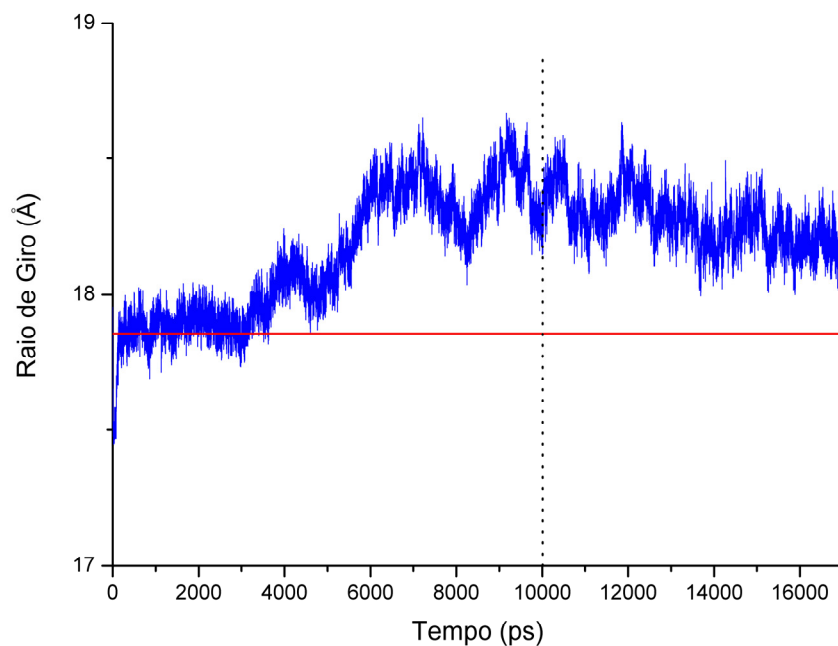
**Fig. 8.** Variação do RMSD, em função do tempo, da molécula de IPF complexada com a InhA. Em preto RMSD do IPF. Em azul o RMSD somente da porção pentaciano do IPF



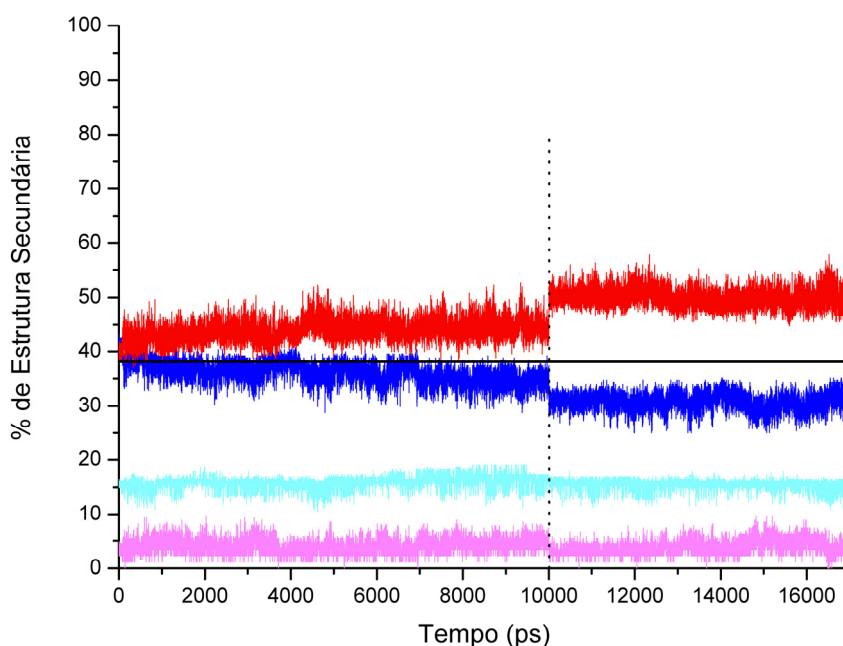
**Fig. 9.** Variação do RMSD do esqueleto polipeptídico da InhA, em relação a estrutura cristalina. A linha pontilhada indica o momento onde ocorreu a remoção do IPF durante a simulação.

## 4.2 – InhA: características estruturais

O RMSD do esqueleto polipeptídico da InhA em relação à sua estrutura cristalina (PDB ID:1ENY) foi calculado com o objetivo de observar a qualidade e convergência da trajetória da DM (Fig. 9). Depois de um rápido aumento durante os primeiros 300 ps, o RMSD do esqueleto polipeptídico aumenta, gradualmente, até 10ns, alcançando um valor próximo a  $2,4 \pm 0,1 \text{ \AA}$  indicando algum grau de mudança conformacional. O IPF foi então removido, e a DM foi prolongada por mais 7ns. Durante esta nova trajetória, o RMSD do esqueleto polipeptídico da enzima alcançou um platô em torno de  $2,5 \pm 0,1 \text{ \AA}$ , nos primeiros 4ns, seguido por uma diminuição gradual durante os próximos 3 ns da trajetória (alcançando um valor de  $2,3 \pm 0,1 \text{ \AA}$ ). Isto indica que a provável causa do aumento no RMSD da InhA foi uma instabilidade da estrutura secundária devido à ligação do IPF. Esta observação está de acordo com o aumento gradual do raio de giro (Rgiro) (Fig. 10) durante os 10 ns da trajetória, alcançando um valor de  $18,5 \pm 0,1 \text{ \AA}$ , entre 9 ns e 10 ns, (Valor do Rgiro da estrutura cristalográfica =  $17,85 \text{ \AA}$ ). Após a remoção da molécula de IPF, o raio de giro da proteína diminuiu gradualmente durante os últimos 7 ns, atingindo um valor de  $18,1 \pm 0,1 \text{ \AA}$  entre 16 ns e 17 ns.



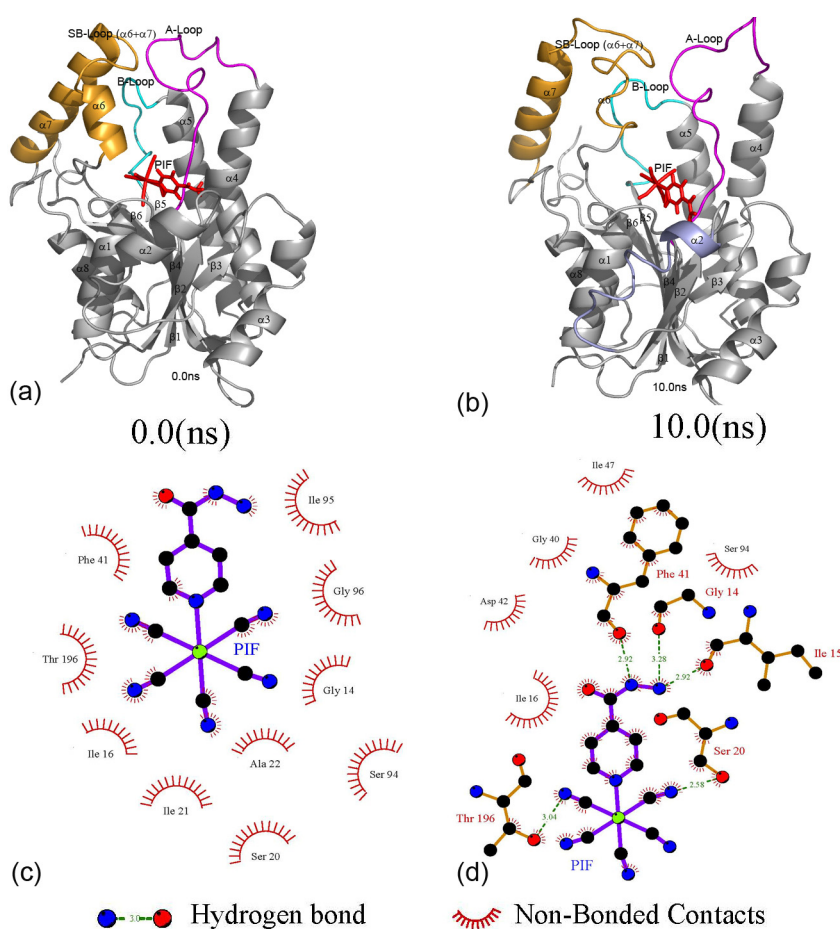
**Fig. 10.** Variação do raio de giro do esqueleto polipeptídico da InhA, em relação a estrutura cristalina. A linha vertical pontilhada indica o momento da remoção do IPF durante a simulação, e a linha horizontal vermelha indica o valor do raio de giro para a estrutura cristalina da InhA (17,85Å).



**Fig. 11.** Variação do conteúdo de estruturas secundárias durante a simulação por DM. A linha vertical pontilhada indica o momento da remoção do IPF durante a simulação. Vermelho: variação no conteúdo de estruturas irregulares; Linha Horizontal: porcentagem inicial de estruturas irregulares; Azul: variação no conteúdo de estruturas do tipo  $\alpha$  hélices; Ciano: variação no conteúdo de estruturas do tipo folhas  $\beta$ ; e Magenta: variação no conteúdo de estruturas do tipo hélice 3-10. A mudança brusca entre o conteúdo de estruturas irregulares e o conteúdo de  $\alpha$  hélices deve-se à perturbação ocorrida com a remoção instantânea do IPF durante a simulação.

Este resultado sugere que, provavelmente, esta alteração conformacional na InhA, pela ligação do IPF, possa ser reversível. Para confirmar esta hipótese, observamos a variação de estrutura secundária da InhA durante toda a DM (17ns), utilizando o programa PROMOTIF (Fig.11) (50).

A partir desta análise, observou-se uma mudança significativa em parte das estruturas secundárias da InhA. Estas alterações podem ser observadas nas figuras (Fig.11, Fig.12 e Fig.13).

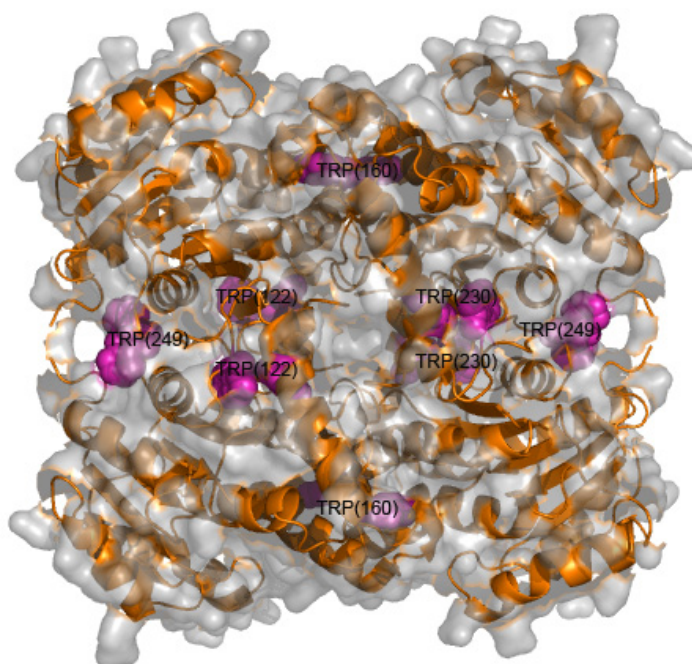


**Fig. 12.** (a) Identificação das estruturas secundárias da enzima InhA no momento inicial da simulação 0,0 ns. (b) Identificação das estruturas secundárias da enzima InhA no momento final da simulação 10,0 ns. (c) Representação gráfica da interação do IPF no momento inicial da simulação 0,0 ns. (d) Representação gráfica da interação do IPF no momento final da simulação 0,0 ns. As imagens A e B foram geradas com o programa PyMOL(48) , baseadas nos resultados obtidos para estruturas secundárias pelo programa Promotif (50)(Fig.13). As figuras C e D foram geradas com o programa Ligplot(51).

A principal alteração observada está relacionada ao conteúdo de  $\alpha$  hélices, que são gradualmente transformadas em estruturas irregulares ao longo da simulação. Comparando as estruturas instantâneas da trajetória com a estrutura inicial da enzima, localizamos estas alterações estruturais que ocorreram, principalmente, no sítio de ligação do substrato, hélices  $\alpha_6$  e  $\alpha_7$  (veja fig. 11 ,12). Estas observações estão em acordo com Sullivan *et al.*, 2006 (58), que observou (através de métodos experimentais) este mesmo tipo de alteração na interação de alquil-difenil-eteres e do triclosan com a InhA. Estas observações são importantes porque sugerem que a associação da molécula de IPF induz uma mudança conformacional no sítio de ligação do substrato, embora não esteja interagindo diretamente com ele.

Ao observar a trajetória da DM é possível verificar que a molécula de IPF fica localizada e estabilizada mais próxima ao sítio de ligação do NADH (Fig.12), o que está de acordo com os resultados experimentais obtidos por Oliveira *et al*, 2006 (1), que sugere que o mecanismo de inibição do IPF envolva a interação deste inibidor com o sítio de ligação do NADH e do substrato (1). Parece plausível, então, sugerir que este mecanismo seja verdadeiro, pois a medida que o IPF se liga ao sítio de ligação do NADH, ele desorganiza o sítio de ligação do substrato, impedindo a associação do substrato à enzima. Talvez por isso tenha sido sugerido que o IPF compete com NADH e o substrato pelos seus respectivos sítios de ligação (34). Além disso, dados experimentais de medição da fluorescência intrínseca da proteína sugere que o IPF, ao se ligar no sítio ativo da enzima, induza uma mudança conformacional durante a formação do complexo enzima-inibidor (36). Esta observação é importante porque a fluorescência intrínseca de uma enzima é um método satisfatório para estudar alterações conformacionais durante a interação desta com outras moléculas (59). Para relacionar o resultado experimental da

fluorescência com o resultado da simulação por DM do sistema IPF-InhA, identificamos e observamos o comportamento dos triptofanos (Trp) em relação a suas áreas acessíveis ao solvente (ASS) ao longo da trajetória. A enzima InhA possui 4 Trp. Eles se localizam: Trp160 – volta A, Trp222 - hélice  $\alpha 7$ , Trp(230) - volta entre hélice  $\alpha 7$  e  $\alpha 8$ , e Trp249 - volta C-terminal. Como foi simulado somente o monômero da InhA, e a estrutura funcional desta enzima é um tetrâmero, a ASS calculadas para os resíduos Trp localizados na superfícies internas do tetrâmero não correspondem ao que seria observado na estrutura quaternária. Este é o caso dos Trp249 e Trp160, que ficam situados na interface do tetrâmero, entre as subunidades. Para superar parcialmente este problema, utilizando as estruturas instantâneas da trajetória em 0 ns e 10 ns, construímos o tetrâmero da InhA (Fig.14) baseado no tetrâmero da PDB ID:1BVR (60), e calculamos a diferença nas ASS dos triptofanos.



**Fig. 14.** Tetrâmero da InhA construído utilizando a estrutura instantânea 0.0 ns, e tendo como molde o tetrâmero 1BVR. Em cinza, representação da superfície molecular do tetrâmero, em laranja a representação da estrutura secundária das subunidades, e em magenta, os triptofanos com seus átomos representados em esferas. Imagem gerada no PyMol (51).

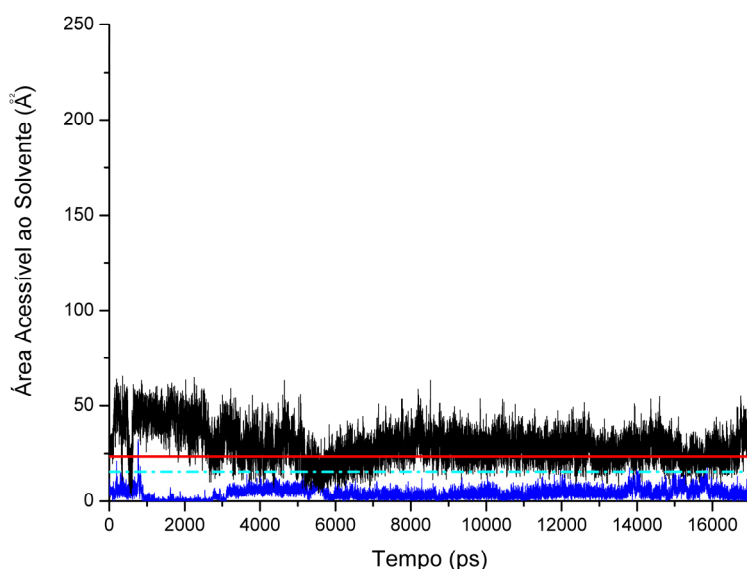
A área acessível ao solvente foi calculada com base em Hubbard S. *et al.*, 1991 (52). Os Trp249 e Trp160 ficam situados internamente no tetrâmero, tendo a sua ASS muito reduzida quando comparada aos valores obtidos somente com uma subunidade ( $\text{Trp160}_{\text{monômero}} = 53.02 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp249}_{\text{monômero}} = 189.91 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp160}_{\text{tetrâmero 0.0 ns}} = 4.62 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp249}_{\text{tetrâmero 0.0 ns}} = 39.51 \text{ \AA}^2$ ) (Tabela1). Já os Trp222 e Trp230 tiveram suas ASS pouco afetada no tetrâmero quando comparada aos valores obtidos somente com a subunidade ( $\text{Trp222}_{\text{monômero}} = 15.55 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp230}_{\text{monômero}} = 23.18 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp222}_{\text{tetrâmero 0.0 ns}} = 11.33 \text{ \AA}^2$ ,  $\text{Trp230}_{\text{Tetrâmero 0.0 ns}} = 17.72 \text{ \AA}^2$ ) (Tabela1). Neste contexto, os Trp222 e Trp230 podem estar diretamente relacionados à alteração na fluorescência da InhA.



**Tabela 1.** Área acessível ao solvente dos triptofanos nos tetrâmeros construídos a partir das estruturas instantâneas 0.0 ns e 10 ns

Subunidade	Trp	Tetrâmero 0.0 ns	Tetrâmero 10.0 ns
A	160	4,62	8,64
A	222	11,33	3,87
A	230	17,72	21,43
A	249	39,51	12,66
B	160	4,63	8,51
B	222	11,33	5,19
B	230	17,73	21,81
B	249	39,51	13,32
C	160	4,62	8,47
C	222	11,33	4,45
C	230	17,72	21,44
C	249	39,51	13,53
D	160	4,63	9,07
D	222	11,32	3,75
D	230	17,72	22,03
D	249	39,51	12,28

Na Tabela 1 podemos observar as ASS dos tetrâmeros no momento inicial (estrutura instantânea 0.0 ns) e ao final da simulação (estrutura instantânea 10 ns). A Figura 15 apresenta a variação das ASS para os Trp222 e Trp230 durante toda a trajetória de 17ns.



**Fig.15** Área acessível ao solvente dos triptofanos no monômero durante a trajetória (17ns). Em preto Trp230 a linha vermelha indica o valor inicial da ASS para a estrutura cristalográfica 1ENY. Em azul Trp222 a linha pontilhada colorida em ciano indica o valor inicial da ASS para a estrutura cristalográfica 1ENY.

Em concordância com Vasconcelos *et al*, 2008 (36), que observou uma redução na fluorescência da proteína mediante a associação com o ligante (resultante da menor exposição dos triptofanos), observamos que há uma redução da soma total das ASS de todos os TRPs (Tabela 01) ao longo da trajetória. Embora exista uma tendência de aumento da ASS do resíduo Trp230 durante a trajetória, é evidente que há uma redução maior da ASS do Trp222, que fica situado na hélice  $\alpha 7$ , onde a maioria das mudanças estruturais da InhA ocorrem. Além disso, o Trp222 corresponde ao resíduo com a ASS menos afetada após a construção dos tetrâmeros, e, portanto, deve ser o resíduo que mais contribua para a diferença na fluorescência observada por Vasconcelos *et al*, 2008 (36). Todos estes dados reforçam a hipótese de que o IPF provoca alterações conformacionais na InhA, concordando com as observações de Sullivan *et al.*, 2006 (58) e Vasconcelos *et al*, 2008 (36).

#### **4.3 - Interação IPF-InhA**

Para verificar o modo de interação do IPF com a InhA, identificamos os resíduos importantes para esta associação, e utilizando o Ligplot (Wallace UM C *et al.*, 1995)(51), identificamos as pontes de hidrogênio e também as interações não-ligantes entre o IPF e a InhA. Para tanto, consideramos como interações não-ligantes qualquer contato a uma distância de 4Å do ligante, durante a trajetória dinâmica. Os resultados estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Assim, identificamos quais resíduos interagem com o IPF, e quais são mais importantes nesta interação.

Nesta análise, observamos que apenas 14 resíduos fazem pontes de hidrogênio com IPF pelo menos uma vez ao longo de toda a trajetória. Os resíduos Gly14, Ile15, Ser20 e Phe41 fazem pontes de hidrogênio com o IPF em mais de

50% do tempo, sendo considerados como os resíduos mais importantes para este tipo de interação. Com exceção do resíduo Phe41, todos os outros resíduos estão situados em uma volta ( $\alpha 1 + \beta 1$ ) que, originalmente, interagia com a porção pirofosfato da molécula do NADH.

**Tabela 2.** Aminoácidos que fazem pontes de hidrogênio com o IPF .

Aminoácidos que fazem pontes de hidrogênio com o IPF	Ocorrência em % de tempo.
Gly14	<b>61,57</b>
Ile15	<b>84,40</b>
Ile16	0,03
Thr17	0,40
Ser20	<b>97,43</b>
Ile21	0,45
Ala22	11,54
Phe41	<b>70,69</b>
Arg43	40,29
Ser94	6,26
Gly96	2,16
Thr196	48,44
Leu197	14,57
Ala198	20,31

Para as interações não-ligantes podemos observar que 23 resíduos interagem com IPF ao longo da dinâmica. Os resíduos Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 e Thr196 são os mais importante nesta interação, interagindo com o IPF em mais de 50% da trajetória de simulação. Estes resíduos ficam situados, respectivamente, na volta formada entre a hélice  $\alpha 1$  e folha  $\beta 1$  (Gly14, Ile15, Ile16, Ser20), na folha  $\beta 2$  (Gly40, Phe41), na hélice  $\alpha 2$  (Ile47), na folha  $\beta 4$  (Ser94) e hélice  $\alpha 6$  (Thr196). É importante enfatizar que estes resíduos, em sua maioria, não estão envolvidos em mutações descritas até o momento, com exceção de Ser94(61).

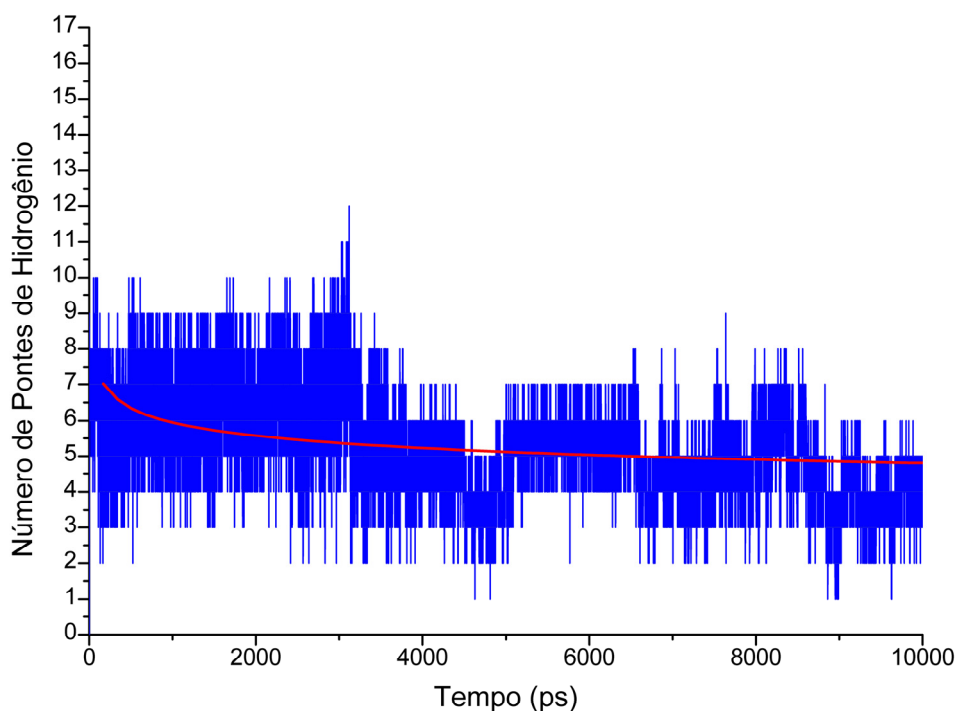
Também foram observados o número total de pontes de hidrogênio e de interações não-ligantes em função do tempo (Figura 16 e 17). Durante a trajetória dinâmica um total de  $5 \pm 2$  pontes de hidrogênio são formadas entre o inibidor (IPF) e a enzima InhA. O número de interações não-ligantes aumenta rapidamente no

início da simulação, mas diminui no curso da dinâmica. Isto provavelmente acontece devido às mudanças conformacionais observadas nas hélices  $\alpha 6$  e  $\alpha 7$ . Todos estes dados, assim como a posição estável do IPF ao longo de toda a trajetória, reforçam a idéia de que a molécula do IPF interage fortemente com a enzima InhA.

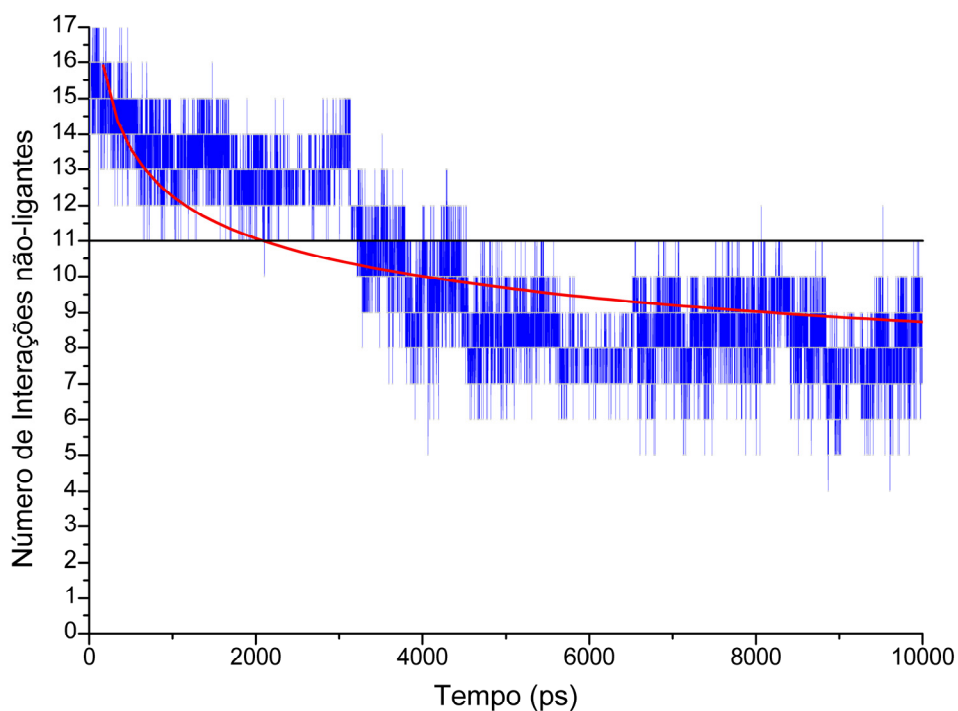
O fato de que os resíduos envolvidos na interação do IPF com a InhA não estarem envolvidos em mutações justifica a habilidade do IPF de inibir tanto o tipo selvagem como o mutante Ile21Val (34). Além disso, a associação do IPF à InhA no sítio de ligação do NADH causa um obstáculo estérico ao co-fator e, ao desorganizar as hélices que fazem parte do sítio de ligação ao substrato, ele inibe a reação catalisada por esta enzima, impedindo sua função, e por consequência levando o MTB a morte.

**Tabela 3.** Aminoácidos que fazem interações não-ligantes com o IPF .

Aminoácidos que fazem interações não-ligantes	Ocorrência em % de tempo.
Ser13	0,02
Gly14	<b>96,00</b>
Ile15	<b>99,02</b>
Ile16	<b>99,64</b>
Thr17	3,33
Ser19	0,03
Ser20	<b>99,08</b>
Ile21	36,22
Ala22	37,74
Gly40	<b>85,47</b>
Phe41	<b>100,00</b>
Asp42	10,95
Arg43	48,88
Ile47	<b>96,55</b>
Ser94	<b>78,73</b>
Ile95	15,41
Gly96	8,90
Phe97	0,37
Met147	2,91
Ile194	0,01
Thr196	<b>68,77</b>
Leu197	37,87
Ala198	34,01



**Fig. 16.** Número total de pontes de hidrogênio da InhA com o IPF em função do tempo. O número de pontes de hidrogênio na estrutura inicial é zero. A linha vermelha mostra um *Fit* não linear realizado para melhor observar o comportamento das Pontes de Hidrogênio durante a trajetória.



**Fig. 17.** Número total de interações não-ligantes da InhA com o IPF em função do tempo. A linha preta indica o número inicial de interações não-ligantes na estrutura inicial. A linha vermelha mostra um *Fit* não linear realizado para melhor observar o comportamento das interações não-ligantes durante a trajetória.

## 5.0 - Conclusões

Neste trabalho, realizamos uma simulação por dinâmica molecular do complexo IPF-InhA, utilizando a enzima tipo selvagem com todos os átomos em solução aquosa, com o objetivo de investigar os eventos moleculares relacionados ao modo de interação droga-alvo e suas afinidades. Apresentamos, também, modelos dinâmicos desta interação e observamos os resíduos de aminoácidos importantes para que ela ocorra.

Desta forma, podemos concluir que:

- 1) O IPF interage com InhA causando mudanças conformacionais significativas na macromolécula.
- 2) A mudança conformacional mais significativa ocorre na alça de ligação ao substrato.
- 3) Os resíduos Gly14, Ile15, Ile16, Ser20, Gly40, Phe41, Ile47, Ser94 e Thr196 são responsáveis por intermediar esta interação.
- 4) O “quenching” da Florescência do complexo IPF-InhA pode ser atribuído às mudanças conformacionais induzidas na InhA pelo IPF alterando a acessibilidade ao solvente dos resíduos de triptofanos.
- 5) O IPF compete diretamente com o NADH e indiretamente com o substrato pelos seus respectivos sítios de ligação.

## 5.1- Perspectivas Futuras

Dentre os projetos futuros e perspectivas abertas por este trabalho podemos relacionar:

- 1) Analisar o possível papel de moléculas de água na interação IPF-InhA. Esta questão não foi abordada no contexto deste trabalho.
- 2) Experimentos de docagem molecular do IPF nos mutantes da InhA disponíveis, preditos por Shroeder et al. (BJ,2005) e no PDB, e simulação por dinâmica molecular destes resultados.
- 3) Simulação por dinâmica molecular dos tipos selvagens e mutantes da InhA interagindo com o IPF a temperatura de 36 graus Celsius.
- 4) Simulações por dinâmica molecular dos tipos selvagens e mutantes da InhA interagindo com o IPF em presença do NADH.
- 5) Experimentos de docagem molecular do IPF em possíveis alvos como MabA ou a *2-trans*-enolredutase (PDB ID:1YXM) humana que possui 30% de similaridade com a InhA de MTB e estrutura secundária semelhante á InhA e portanto pode ser um provável alvo para o IPF.

## 6.0 - Anexos

### 6.1- Parâmetros do IPF

ipf\_cgu\_mol2\_prep.prep:

```
IPF INT 0
CORRECT OMIT DU BEG
0.0000
 1 DUMM DU M 0 -1 -2 0.000 .0 .0 .00000
 2 DUMM DU M 1 0 -1 1.449 .0 .0 .00000
 3 DUMM DU M 2 1 0 1.522 111.1 .0 .00000
 4 N12 NT M 3 2 1 1.540 111.208 180.000 -0.66700
 5 H13 H E 4 3 2 1.000 117.504 144.125 0.34300
 6 H14 H E 4 3 2 0.999 65.507 -114.027 0.34300
 7 N11 N M 4 3 2 1.386 47.005 48.320 -0.48400
 8 H11 H E 7 4 3 1.000 117.467 61.193 0.31100
 9 C11 C M 7 4 3 1.385 121.527 -157.520 0.76600
10 O11 O E 9 7 4 1.205 117.169 -152.790 -0.69200
11 C8 CA M 9 7 4 1.492 119.194 28.627 0.33800
12 C9 CA B 11 9 7 1.386 123.103 34.252 -0.64200
13 H9 HA E 12 11 9 1.072 121.743 -1.089 0.21900
14 C10 CA S 12 11 9 1.385 118.536 179.480 0.34300
15 H10 H4 E 14 12 11 1.071 121.533 -179.891 0.14100
16 C7 CA M 11 9 7 1.385 118.379 -147.481 -0.64200
17 H7 HA E 16 11 9 1.074 120.930 0.229 0.21900
18 C6 CA M 16 11 9 1.388 118.591 179.284 0.34300
19 H6 H4 E 18 16 11 1.070 121.665 -178.362 0.14100
20 N6 NC M 18 16 11 1.319 122.462 1.393 -0.11100
21 Fe Fe M 20 18 16 2.344 120.884 -175.160 -0.81000
22 C2 CE S 21 20 18 2.244 83.997 -137.061 0.30200
23 N2 NY E 22 21 20 1.155 172.110 -19.065 -0.79600
24 C3 CF S 21 20 18 2.243 83.875 43.461 0.30200
25 N3 NY E 24 21 20 1.155 172.708 -13.351 -0.79600
26 C4 CG S 21 20 18 2.247 84.109 134.170 0.30200
27 N4 NY E 26 21 20 1.155 172.918 16.392 -0.79600
28 C5 CH S 21 20 18 2.237 84.255 -45.610 0.30200
29 N5 NY E 28 21 20 1.155 172.553 18.441 -0.79600
30 C1 CY M 21 20 18 2.191 179.745 119.733 0.31500
31 N1 NY M 30 21 20 1.153 179.958 -161.232 -0.79500
```

```
LOOP
  N6 C10
```

```
IMPROPER
C11 H11 N11 N12
C8 N11 C11 O11
C11 C9 C8 C7
C8 C10 C9 H9
C9 H10 C10 N6
C8 C6 C7 H7
C7 H6 C6 N6
C10 C6 N6 Fe
```

```
DONE
STOP
```



## 6.2- Parâmetros do Campo de Força do IPF

### frcmmod:

#### MASS

NT	14.010	0.530	sp3 N for amino groups amino groups
H	1.0080	0.161	H bonded to nitrogen atoms
N	14.010	0.530	sp2 nitrogen in amide groups
C	12.010	0.616	sp2 C carbonyl group
O	16.000	0.434	carbonyl group oxygen
CA	12.010	0.360	sp2 C pure aromatic (benzene)
HA	1.0080	0.167	arom. bond. to C without electrwd. groups
H4	1.0080	0.167	H arom. bond. to C with 1 electrwd. group
Fe	55.000	0.000	Heme
CY	12.010	0.360	Nitrile C (Howard et al.JCC,16,243,1995)
CE	12.010	0.360	same as CY
CF	12.010	0.360	same as CY
CG	12.010	0.360	same as CY
CH	12.010	0.360	same as CY
NY	14.010	0.530	Nitrile N (Howard et al.JCC,16,243,1995)
NC	14.010	0.530	Same as n2

#### BOND

NT-H	434.00	1.010	for neutral amines
NT-N	443.30	1.408	same as n -n3
N -H	434.00	1.010	JCC,7,(1986),230; AA
N -C	490.00	1.335	JCC,7,(1986),230; AA
C -O	570.00	1.229	JCC,7,(1986),230; AA,CYT,GUA,THY,URA
C -CA	469.00	1.409	JCC,7,(1986),230; (not used any more in TYR)
CA-CA	469.00	1.400	JCC,7,(1986),230; BENZENE,PHE,TRP,TYR
CA-HA	367.00	1.080	changed from 340. bsd on C6H6 nmodes;
CA-H4	367.00	1.080	changed from 340. bsd on C6H6 nmodes;
CA-NC	492.90	1.336	same as ca-nc JCC,7,(1986),230; GUA
CY-NY	600.00	1.150	Howard et al JCC,16,243,1995
NC-Fe	50.00	1.962	*Heme and ~Olab
Fe-CY	200.00	1.968	*Heme and ~Olab
Fe-CE	200.00	1.968	*Heme and ~Olab
Fe-CF	200.00	1.968	*Heme and ~Olab
Fe-CG	200.00	1.968	*Heme and ~Olab
Fe-CH	200.00	1.968	*Heme and ~Olab
CE-NY	600.0	1.150	Same CY-NY
CF-NY	600.0	1.150	Same CY-NY
CG-NY	600.0	1.150	Same CY-NY
CH-NY	600.0	1.150	Same CY-NY

#### ANGLE

NT-N -H	49.300	114.330	same as hn-n -n3
NT-N -C	67.100	120.430	same as c -n -n3
H -NT-H	35.000	109.50	neutral amines
H -NT-N	51.000	106.570	same as hn-n3-n
N -C -O	80.000	122.90	AA general
N -C -CA	70.592	114.240	Calculated with empirical approach
H -N -C	49.200	118.460	same as c -n -hn
C -CA-CA	67.900	120.700	same as c -c2-c2
O -C -CA	72.800	119.120	same as c2-c -o
CA-CA-HA	50.000	120.00	Parm99.dat
CA-CA-CA	63.000	120.00	changed from 85.0 bsd on C6H6 nmodes
CA-CA-H4	50.000	120.00	Parm99.dat
CA-CA-NC	70.100	119.720	same as ca-ca-nc
CA-NC-CA	70.700	109.950	same as ca-nc-ca
H4-CA-NC	52.400	120.540	same as ha-c2-n2
NC-Fe-CE	40.000	84.000	MEDIAS dos ângulos do PDB otimizado por
NC-Fe-CF	40.000	84.000	Chang-Guo Zhang medidos através do SPDBV
NC-Fe-CG	40.000	84.000	
NC-Fe-CH	40.000	84.000	
NC-Fe-CY	40.000	180.000	
Fe-CE-NY	40.000	172.580	
Fe-CF-NY	40.000	172.580	
Fe-CG-NY	40.000	172.580	
Fe-CH-NY	40.000	172.580	
Fe-CY-NY	40.000	180.000	
CE-Fe-CF	40.000	170.000	
CE-Fe-CG	30.000	90.000	
CE-Fe-CH	35.000	90.000	
CE-Fe-CY	37.000	96.000	
CF-Fe-CG	30.000	90.000	
CF-Fe-CH	35.000	90.000	
CF-Fe-CY	37.000	96.000	
CG-Fe-CH	40.000	170.000	

CG-Fe-CY	37.000	96.000
CH-Fe-CY	37.000	96.000
CA-NC-Fe	50.000	122.000

DIHE

CA-CA-CA-NC	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on.C6H6
CA-CA-NC-CA	2	9.600	180.000	2.000	JCC,7,(1986),230
HA-CA-CA-NC	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
CA-NC-CA-H4	2	9.600	180.000	2.000	JCC,7,(1986),230
NT-N -C -O	4	10.000	180.000	2.000	AA,NMA
NT-N -C -CA	4	10.000	180.000	2.000	AA,NMA
H -NT-N -H	1	1.075	0.000	2.000	same as X -n -n3-X
H -NT-N -C	1	1.075	0.000	2.000	same as X -n -n3-X
N -C -CA-CA	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
H -N -C -O	1	2.500	180.000	2.000	same as X -c -n -X
H -N -C -CA	1	2.500	180.000	2.000	same as X -c -n -X
C -CA-CA-HA	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
C -CA-CA-CA	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
O -C -CA-CA	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
CA-CA-CA-H4	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
CA-CA-CA-HA	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
CA-CA-CA-CA	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
HA-CA-CA-H4	4	14.500	180.000	2.000	intrpol.bsd.on C6H6
CA-NC-Fe-CE	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CA-NC-Fe-CF	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CA-NC-Fe-CG	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CA-NC-Fe-CH	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CA-NC-Fe-CY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NC-Fe-CE-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NC-Fe-CF-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NC-Fe-CG-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NC-Fe-CH-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NC-Fe-CY-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CE-Fe-CF-NY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
CE-Fe-CG-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CE-Fe-CH-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CE-Fe-CY-NY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
CF-Fe-CG-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CF-Fe-CH-NY	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
CF-Fe-CY-NY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
CG-Fe-CH-NY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
CG-Fe-CY-NY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
CH-Fe-CY-NY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CE-Fe-CF	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CE-Fe-CG	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CE-Fe-CH	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CE-Fe-CY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CF-Fe-CG	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CF-Fe-CH	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CF-Fe-CY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CG-Fe-CH	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CG-Fe-CY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CH-Fe-CY	1	0.100	0.000	2.000	Empirical approach
NY-CY-Fe-NC	1	0.050	0.000	2.000	Empirical approach

IMPROPER

C -H -N -NT	50.1	180.0	2.0	Using default value
CA-N -C -O	50.1	180.0	2.0	JCC,7,(1986),230
C -CA-CA-CA	50.1	180.0	2.0	Using default
CA-CA-CA-HA	50.1	180.0	2.0	bsd.on C6H6 nmodesvalue
CA-H4-CA-NC	50.1	180.0	2.0	bsd.on C6H6 nmodes value
CA-CA-NC-Fe	50.1	180.0	2.0	Using default

NONBON

NT	1.8240	0.1700	same as n3
H	0.6000	0.0157	!Ferguson base pair geom.
N	1.8240	0.1700	OPLS
C	1.9080	0.0860	OPLS
O	1.6612	0.2100	OPLS
CA	1.9080	0.0860	same as ca
HA	1.4590	0.0150	Spellmeyer
H4	1.4090	0.0150	Spellmeyer, one electrowithdr. neighbor
Fe	2.0800	0.1340	Table 1, Desai & Zimmer, Dalt.Trans,2004,page874.
CY	1.9080	0.0860	same as c1
CE	1.9080	0.0860	same as c1
CF	1.9080	0.0860	same as c1
CG	1.9080	0.0860	same as c1
CH	1.9080	0.0860	same as c1
NY	1.8240	0.1700	N in nitrile
NC	1.8240	0.1700	same as nc

## 6.3 - Arquivos de entrada para as simulações da dinâmica molecular

### leap.in:

```
source leaprc.ff99SB
loadamberprep ../Antechamber_Mol2/ipf_cgu_mol2_prep.prep
saveoff IPF ../Antechamber_Mol2/ipf.lib
loadoff ../Antechamber_Mol2/ipf.lib
mods=loadAmberParams ../Parmchk/frcmod
mod=loadAmberParams frcmod.ff99SB
seq=(NALA GLY LEU LEU ASP GLY LYS ARG ILE LEU VAL SER GLY
ILE ILE THR ASP SER SER ILE ALA PHE HIE ILE ALA ARG
VAL ALA GLN GLU GLN GLY ALA GLN LEU VAL LEU THR GLY
PHE ASP ARG LEU ARG LEU ILE GLN ARG ILE THR ASP ARG
LEU PRO ALA LYS ALA PRO LEU LEU GLU LEU ASP VAL GLN
ASN GLU GLU HID LEU ALA SER LEU ALA GLY ARG VAL THR
GLU ALA ILE GLY ALA GLY ASN LYS LEU ASP GLY VAL VAL
HIS SER ILE GLY PHE MET PRO GLN THR GLY MET GLY ILE
ASN PRO PHE PHE ASP ALA PRO TYR ALA ASP VAL SER LYS
GLY ILE HIP ILE SER ALA TYR SER TYR ALA SER MET ALA
LYS ALA LEU LEU PRO ILE MET ASN PRO GLY GLY SER ILE
VAL GLY MET ASP PHE ASP PRO SER ARG ALA MET PRO ALA
TYR ASN TRP MET THR VAL ALA LYS SER ALA LEU GLU SER
VAL ASN ARG PHE VAL ALA ARG GLU ALA GLY LYS TYR GLY
VAL ARG SER ASN LEU VAL ALA ALA GLY PRO ILE ARG THR
LEU ALA MET SER ALA ILE VAL GLY GLY ALA LEU GLY GLU
GLU ALA GLY ALA GLN ILE GLN LEU LEU GLU GLU GLY TRP
ASP GLN ARG ALA PRO ILE GLY TRP ASN MET LYS ASP ALA
THR PRO VAL ALA LYS THR VAL CYS ALA LEU LEU SER ASP
TRP LEU PRO ALA THR THR GLY ASP ILE ILE TYR ALA ASP
GLY GLY ALA HIS THR GLN LEU CLEU IPF}
COMPLEXO = loadPdbUsingSeq ../PDBS_COMPLEXO/Complexo1ENY_IPF.pdb seq
solvateBox COMPLEXO TIP3PBOX 10
addIons COMPLEXO Na+ 6
savepdb COMPLEXO 1ENY-NADH_IPF_A9.pdb
saveamberparm COMPLEXO 1ENY-NADH_IPF_A9.top 1ENY-NADH_IPF_A9.crd
quit
```

### mini\_00.in:

```
&cntrl
  imin=1, nmropt=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
  nt xo=1, ntpr=50,
  ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
  ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
  ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=25.0, restraintmask=':1-269',
  maxcyc=500, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
  ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0,
  ivcap=0,
  ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
  igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
  verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/
```

### mini\_01.in:

```
&cntrl
  imin=1, nmropt=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
  nt xo=1, ntpr=50,
  ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
  ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
  ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=20.0, restraintmask=':1-269',
  maxcyc=100, ncyc=10, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
  ntc=1, tol=0.00001, jfastw=0,
  ivcap=0,
  ntf=1, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
  igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
  verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/
```

### mini\_02.in:

```
&cntrl
  imin=1, nmropt=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
  nt xo=1, ntpr=50,
  ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
  ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
  ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=10.0, restraintmask=':1-269',
```

```

maxcyc=100, nccyc=10, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
ivcap=0,
ntf=2, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/

```

### mini\_03.in:

```

&cntrl
imin=1, nmropt=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
ntxo=1, ntpr=50,
ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=5.0, restraintmask=':1-269',
maxcyc=100, nccyc=10, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
ivcap=0,
ntf=2, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/

```

### mini\_04.in:

```

&cntrl
imin=1, nmropt=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
ntxo=1, ntpr=50,
ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
ibelly=0, ntr=1, restraint_wt=1.0, restraintmask=':1-269',
maxcyc=100, nccyc=10, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
ivcap=0,
ntf=2, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/

```

### mini\_05.in:

```

&cntrl
imin=1, nmropt=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
ntxo=1, ntpr=50,
ntwr=50, iwrap=0, ntwx=50, ntwv=0, ntwe=0,
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
ibelly=0, ntr=0, restraint_wt=0.0, restraintmask=':1-269',
maxcyc=100, nccyc=10, ntmin=1, dx0=0.01, drms=1.0E-4,
ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
ivcap=0,
ntf=2, ntb=2, ntp=1, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/

```

### mdcp\_01.in:

```

&cntrl
imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
ntxo=1, ntpr=250,
ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',
nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
ntt=1, temp0=50.0, tempi=10.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,
ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
ntc=2, tol=0.00001,jfastw=0,
ivcap=0,
ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald

```

```
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,  
/  

```

### mdcp\_02.in:

```
&cntrl  
imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,  
ntxo=1, ntpr=250,  
ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,  
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,  
ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',  
nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,  
isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,  
ntt=1, temp=100.0, tempi=50.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,  
ntp=1, pres=1.0, comp=44.6, taup=2.0,  
ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,  
ivcap=0,  
ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,  
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,  
/  
&ewald  
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,  
/  

```

### mdcp\_03.in:

```
&cntrl  
imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,  
ntxo=1, ntpr=250,  
ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,  
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,  
ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',  
nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,  
isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,  
ntt=1, temp=150.0, tempi=100.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,  
ntp=1, pres=1.0, comp=44.6, taup=2.0,  
ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,  
ivcap=0,  
ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,  
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,  
/  
&ewald  
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,  
/  

```

### mdcp\_04.in:

```
&cntrl  
imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,  
ntxo=1, ntpr=250,  
ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,  
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,  
ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',  
nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,  
isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,  
ntt=1, temp=200.0, tempi=150.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,  
ntp=1, pres=1.0, comp=44.6, taup=2.0,  
ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,  
ivcap=0,  
ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,  
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,  
/  
&ewald  
verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,  
/  

```

### mdcp\_05.in:

```
&cntrl  
imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,  
ntxo=1, ntpr=250,  
ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,  
ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,  
ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',  
nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,  
isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,  
ntt=1, temp=250.0, tempi=200.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,  
ntp=1, pres=1.0, comp=44.6, taup=2.0,  
ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,  
ivcap=0,  
ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,  
igb=0, ievb=0, iamoeba=0,  
/  

```

```
&ewald
  verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/
```

### mdcp\_06.in:

```
&cntrl
  imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
  ntxo=1, ntpr=250,
  ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
  ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
  ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',
  nstlim=10000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
  isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
  ntt=1, temp0=298.16, tempi=250.0, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,
  ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
  ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,
  ivcap=0,
  ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
  igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
  verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/
```

### mdcp\_07.in:

```
&cntrl
  imin=0, ntx=1, irect=0, ntrx=1,
  ntxo=1, ntpr=250,
  ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
  ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
  ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',
  nstlim=40000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
  isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
  ntt=1, temp0=298.16, tempi=298.16, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,
  ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
  ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,
  ivcap=0,
  ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
  igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
  verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/
```

### mdcp\_prod\_01.in

```
&cntrl
  imin=0, ntx=5, irect=1, ntrx=1,
  ntxo=1, ntpr=250,
  ntwr=250, iwrap=0, ntwx=250, ntwv=0, ntwe=0,
  ioutfm=0, ntwprt=0, idecomp=0,
  ibelly=0, ntr=0, bellymask=':1-1', restraint_wt=100.0, restraintmask=':2-823',
  nstlim=50000, nscm=1000, t=0.0, dt=0.002, nrespa=1,
  isgld=0, tsgavg=0.2, tempsg=1.0, sgft=0.0, isgsta=1, isgend=1,
  ntt=1, temp0=298.16, tempi=298.16, ig=71277, tautp=1.0, gamma_ln=0, vrand=0, vlimit=20.0,
  ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0,
  ntc=2, tol=0.00001, jfastw=0,
  ivcap=0,
  ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, cut=9.0, scnb=2.0, scee=1.2, nsnb=25, ipol=0, ifqnt=0,
  igb=0, ievb=0, iamoeba=0,
/
&ewald
  verbose=0, ew_type=0, nbflag=1, use_pme=1, vdwmeth=1, eedmeth=1, netfrc=0,
/
```

## Referências

- (1) Oliveira JS, Souza EHS, Souza ON, Moreira ÍS, Santos DS, Basso LA. Slow-Onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex Pp. *Current Pharmaceutical Design* 2006;12(19):2409-24.
- (2) World Health Organization. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2002 2002.
- (3) World Health Organization. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2003 2003.
- (4) World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2005.
- (5) World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2006.
- (6) World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2006.
- (7) World Health Organization. New Technologies For Tuberculosis Control: A Guide For Their Adoption, Introduction and Implementation. WHO Report 2007.
- (8) World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2004.
- (9) Ballell L, Field RA, Duncan K, Young RJ. New Small-Molecule Synthetic Antimycobacterials. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jun 1;49(6):2153-63.
- (10) Dye C, Williams BG. Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis. *PNAS* 2000 Jul 5;97(14):8180-5.
- (11) Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Growth at the Cavity Surface: a Microenvironment with Failed Immunity. *Infect Immun* 2003 Dec 1;71(12):7099-108.
- (12) Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2001 Oct 1;14(4):836-71.
- (13) van Doorn HR, Claas ECJ, Templeton KE, van der Zanden AGM, te Koppele Vije A, de Jong MD, et al. Detection of a Point Mutation Associated with High-Level Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Using Real-Time PCR Technology with 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes. *J Clin Microbiol* 2003 Oct 1;41(10):4630-5.
- (14) Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, et al. Molecular Analysis of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from England and Wales Reveals the Phylogenetic Significance of the *ahpC* - 46A Polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Apr 1;49(4):1455-64.

- (15) Meacci F, Orru G, Iona E, Giannoni F, Piersimoni C, Pozzi G, et al. Drug Resistance Evolution of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain from a Noncompliant Patient. *J Clin Microbiol* 2005 Jul 1;43(7):3114-20.
- (16) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998 Jun 11;393(6685):537-44.
- (17) Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* 1997 Dec;1(4):579-88.
- (18) Domenech P, Barry III CE, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Current Opinion in Microbiology* 2001 Feb 1;4(1):28-34.
- (19) Schroeder EK, de Souza ON, Santos DS, Blanchard JS&BLA. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotech* 2002;3:197-225.
- (20) Boshoff HI, Mizrahi V, Barry CE, III. Effects of Pyrazinamide on Fatty Acid Synthesis by Whole Mycobacterial Cells and Purified Fatty Acid Synthase I. *J Bacteriol* 2002 Apr 15;184(8):2167-72.
- (21) Draper P. Lipid biochemistry takes a stand against tuberculosis. *Nature Medicine* 2000;6:977-8.
- (22) Vilcheze C, Morbidoni HR, Weisbrod TR, Iwamoto H, Kuo M, Sacchettini JC, et al. Inactivation of the inhA-Encoded Fatty Acid Synthase II (FASII) Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Induces Accumulation of the FASII End Products and Cell Lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 2000 Jul 15;182(14):4059-67.
- (23) Raman K, Rajagopalan P, Chandra N. Flux Balance Analysis of Mycolic Acid Pathway: Targets for Anti-Tubercular Drugs. *PLoS Comput Biol* 2005 Oct 14;1(5):349-58.
- (24) Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2005 Jan 1;18(1):81-101.
- (25) Nguyen M, Quemard A, Broussy S, Bernadou J, Meunier B. Mn(III) Pyrophosphate as an Efficient Tool for Studying the Mode of Action of Isoniazid on the InhA Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Jul 1;46(7):2137-44.
- (26) Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *PNAS* 2003 Nov 25;100(24):13881-6.
- (27) Smith CV, Sacchettini JC. *Mycobacterium tuberculosis*: a model system for structural genomics. *Current Opinion in Structural Biology* 2003 Dec;13(6):658-64.
- (28) Wei CJ, Lei B, Musser JM, Tu SC. Isoniazid Activation Defects in Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG)



- Mutants Evident in InhA Inhibitor Production. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Feb 1;47(2):670-5.
- (29) Dahle UR, Sandven P, Heldal E, Mannsaaker T, Caugant DA. Deciphering an Outbreak of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003 Jan 1;41(1):67-72.
- (30) Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP, Barco P, Cecon L, Forestiero F, et al. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Sep 1;48(9):3373-81.
- (31) Ducasse-Cabanot S, Cohen-Gonsaud M, Marrakchi H, Nguyen M, Zerbib D, Bernadou J, et al. In Vitro Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase MabA by Isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jan 1;48(1):242-9.
- (32) Hazbon MH, Bobadilla del Valle M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Filliol I, Cavatore M, et al. Role of embB Codon 306 Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Revisited: a Novel Association with Broad Drug Resistance and IS6110 Clustering Rather than Ethambutol Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Sep 1;49(9):3794-802.
- (33) Lavender C, Globan M, Sievers A, Billman-Jacobe H, Fyfe J. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Oct 1;49(10):4068-74.
- (34) Oliveira JS, Souza EHS, Basso LA, Palaci M, Dietze R, Santos DS, et al. An inorganic iron complex that inhibits *wild-type* and an isoniazid-resistant mutant *2-trans-enoyl-ACP (CoA)* reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Commun* 2004;312-3.
- (35) Souza EHS, Pontesa DL, Diógenes ICN, Lopesa LGF, Oliveira JS, Basso LA, et al. Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate(III)/(II) complexes: a model system for the in vitro activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2004 Oct 6;99(2):368-75.
- (36) Vasconcelos IB, E.Meyerb, F.A.M.Salesb, I.S.Moreirab, L.A.Bassoa, D.S.Santosa. The Mode of Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Wild-Type and Isoniazid-Resistant *2-Trans-Enoyl-ACP(CoA) Reductase* Enzymes by An Inorganic Complex. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 2008;7.
- (37) Brian K.Shoichet. Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 2004 Dec 16;432:862-5.
- (38) Terstappen G.C., Reggiani A. In silico research in drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001 Jan 1;22(1):23-6.
- (39) Nyarady Z, Czompoly T, Bosze S, Nagy G, Petrohai A, Pal J, et al. Validation of in silico prediction by in vitro immunoserological results of fine epitope mapping on citrate synthase specific autoantibodies. *Molecular Immunology* 2006 Mar;43(7):830-8.

- (40) Karplus M, MacCammon JA. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *nature structural biology* 2002 Sep;9(9):646-52.
- (41) E.Cheatham, I T, R.Brooks B. Recent advances in molecular dynamics simulation towards the realistic representation of biomolecules in solution. *Theoretical Chemistry Accounts* 99, 279-288. 1998.
- (42) Koretke KK, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG. Self-consistently optimized energy functions for protein structure prediction by molecular dynamics. *PNAS* 1998 Mar 17;95(6):2932-7.
- (43) Jaramillo A, Wodak SJ. Computational Protein Design Is a Challenge for Implicit Solvation Models. *Biophys J* 2005 Jan 1;88(1):156-71.
- (44) Brooks BRea. *CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*. *J Comput Chem* 1983;187-217.
- (45) Weiner PW&KPA. AMBER: assisted model building with energy refinement. A general program for modelling molecules and their interactions. *J Comput Chem* 1981;2:287-303.
- (46) Scott WRPeal. The GROMOS biomolecular simulation program package. *J Phys Chem* 1999;A 103:3596-607.
- (47) Guex N&PMC. SWISS\_MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714-23.
- (48) The PyMOL Molecular Graphics System . 2002.
- (49) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures [computer program]. . *Appl. Cryst.* (1993). 26, 283-291; 1993.
- (50) PROMOTIF-A program to identify and analyze structural motifs in proteins [computer program]. *Protein Science*; 1996.
- (51) LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.*, 8, 127-134; 1995.
- (52) Naccess - accessibility calculations . *J.Mol.Biol.*220,507-530; 1991.
- (53) Benz RW, Castro-Roman F, Tobias DJ, White SH. Experimental Validation of Molecular Dynamics Simulations of Lipid Bilayers: A New Approach. *Biophys J* 2005 Feb 1;88(2):805-17.
- (54) Zhang Y, Garcia MJ, Lathigra R, Allen B, Moreno C, van Embden JD, et al. Alterations in the superoxide dismutase gene of an isoniazid-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1992 Jun 1;60(6):2160-5.
- (55) Zhang Y, Post-Martens K, Denkin S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discovery Today* 2006 Jan;11(1-2):21-7.
- (56) Wang F, Langley R, Gulten G, Dover LG, Besra GS, Jacobs WR, Jr., et al. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* 2007 Jan 16;jem.

- (57) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994 Jan 14;263(5144):227-30.
- (58) Sullivan TJ, Truglio JJ, Boyne ME, Novichenok P, Zhang X, Stratton CF, et al. High Affinity InhA Inhibitors with Activity against Drug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol* 2006 Feb 17;1(1):43-53.
- (59) Chen Y, Barkley MD. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins. *Biochemistry* 1998 Jun 24;37:9976-82.
- (60) Rozwarski DA, Vilcheze C, Sugantino M, Bittman R, Sacchettini JC. Crystal Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl-ACP Reductase, InhA, in Complex with NAD<sup>+</sup> and a C16 Fatty Acyl Substrate. *J Biol Chem* 1999 May 28;274(22):15582-9.
- (61) Oliveira JS, Canduri F, Rodrigues NC, de Souza ON, de Azevedo Jr. WF, Basso LA, et al. Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* 2006;359:646-66.