



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia Molecolare e Applicata

**MECCANISMO DI INIBIZIONE DI NUOVI DERIVATI DI BERBERINA
CON TARGET LA POMPA DI EFFLUSSO MexXY-OprM DI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

**INHIBITION MECHANISM OF NEW BERBERINE DERIVATIVES
TARGETING THE MexXY-OprM EFFLUX PUMP OF PSEUDOMONAS
AERUGINOSA**

Tesi di Laurea Magistrale di

Venanzio Daniele Tosiani

Mat.1102767

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

Roberta Galeazzi

Sessione estiva

Anno accademico 2023/2024

A mio nonno Gino.

INDICE

1. Introduzione.....	7
1.1 Obiettivo della tesi.....	7
1.2 Berberina e derivati.....	9
2. Pseudomonas aeruginosa.....	11
2.1 Informazioni generali.....	11
2.2 Antibiotico resistenze in P. aeruginosa.....	14
2.3 Antibiotico resistenza efflusso-mediata.....	16
3. Pompe di efflusso.....	17
3.1 Suddivisione delle pompe di efflusso.....	17
3.2 Struttura di MexXY-OprM.....	19
3.3 Schema di funzionamento.....	22
3.4 Riconoscimento del substrato.....	23
3.5 Efflux Pump Inhibitors (EPI).....	24
4. Materiali e metodi.....	27
4.1 Docking molecolare.....	27

4.1.1 Autodock.....	29
4.2 Virtual Screening.....	31
4.2.1 Openbabel.....	33
4.2.2 Raccoon.....	33
4.2.3 Chemdraw.....	34
4.3 Minimizzazione dell'energia.....	34
4.3.1 GaussView/G16.....	35
4.4 Dinamica molecolare.....	36
4.4.1 CHARMM-GUI.....	37
4.4.2 GROMACS.....	38
4.4.3 g_mmpbsa.....	38
4.5 Prove microbiologiche in vitro.....	39
5. Risultati del Virtual Screening.....	40
5.1 Risultati dalla libreria di composti dell'Università di Urbino.....	40
5.2 (OFF-TOPIC) Prospettive future: LasR e Quorum Sensing.....	58
6. Docking dei composti scelti con PA7 e ceppi clinici.....	71

6.0 Parametri utilizzati per il docking.....	71
6.1.1 Docking di 1972 R con PA7.....	73
6.1.2 Docking di 1972 R con AR48.....	74
6.1.3 Docking di 1972 R con AR86... ..	75
6.1.4 Docking di 1972 R con C15.....	76
6.1.5 Docking di 1972 R con NC04.....	77
6.2.1 Docking di 1972 S con PA7.....	78
6.2.2 Docking di 1972 S con AR48.....	79
6.2.3 Docking di 1972 S con AR86... ..	80
6.2.4 Docking di 1972 S con C15.....	81
6.2.5 Docking di 1972 S con NC04.....	82
6.3.1 Docking di 1994 R con PA7.....	83
6.3.2 Docking di 1994 R con AR48.....	84
6.3.3 Docking di 1994 R con AR86... ..	85
6.3.4 Docking di 1994 R con C15.....	86
6.3.5 Docking di 1994 R con NC04.....	87

6.4.1 Docking di 1994 S con PA7.....	88
6.4.2 Docking di 1994S con AR48.....	89
6.4.3 Docking di 1994 S con AR86... ..	90
6.4.4 Docking di 1994 S con C15.....	91
6.4.5 Docking di 1994 S con NC04.....	92
6.5 Resoconto.....	94
7. Risultati di dinamica molecolare.....	96
7.0 Parametri utilizzati per la dinamica molecolare.....	96
7.1.1 Dinamica molecolare di 1994 R su PA7.....	97
7.1.2 Dinamica molecolare di 1994 R su NC04.....	100
7.1.3 Dinamica molecolare di 1994 S su PA7.....	103
7.1.4 Dinamica molecolare di 1994 S su PA7.....	106
7.2.1 Dinamica molecolare di 1972 R su PA7.....	109
7.2.2 Dinamica molecolare di 1972 S su PA7.....	112
7.3 Calcolo dell'energia di interazione short range (SR).....	115
7.4 Risultati di g_mmpbsa.....	117

7.5 Sovrapposizione pre- e post-dinamica.....	124
7.6 Sovrapposizioni e confronti post-dinamica fra i vari enantiomeri...	129
7.7 Risultati ottenuti dalle prove microbiologiche in vitro.....	134
8. Conclusioni e discussione.....	136
Bibliografia.....	139
Ringraziamenti.....	155

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Obiettivo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è di valutare i meccanismi di interazione di nuovi derivati sintetici della Berberina nel testo nominati come 1972 e 1994 in entrambe le loro forme enantiomeriche R ed S, identificati mediante un protocollo di *Virtual Screening* quali inibitori del meccanismo di resistenza MexXY-OprM di *Pseudomonas Aeruginosa*. Nello specifico la proteina MexY è parte del sistema di efflusso MexXY-OprM e una sua over-espressione causa resistenza agli aminoglicosidi, favorendo così l'insorgenza di varie patologie, tra cui importanti e rischiose patologie nosocomiali come la fibrosi cistica¹.

Questi inibitori sono stati testati in vitro singolarmente e sinergicamente con la Tobramicina, uno dei più utilizzati aminoglicosidi, antibiotici in grado di bloccare la sintesi proteica andando ad interagire con la subunità ribosomiale 30S e che, a causa di fenomeni di antibiotico resistenza, vengono estrusi dalla pompa MexXY-OprM.

La scelta del sito specifico di interazione è ricaduta un sito all'interno di MexY denominato sito *cleft* o Allosterico a causa dell'elevata affinità di questi composti verso di esso.

L'intero lavoro è stato condotto considerando la variabilità amminoacidica di MexY in un ceppo resistente di laboratorio di *Pseudomonas Aeruginosa* denominato PA7 e in quattro ceppi clinici denominati AR48, AR86, C15 ed NC04.

Il mio lavoro è partito dall'analizzare tramite *Virtual Screening* tutti i composti analoghi alla Berberina presenti all'interno di un database di 2022 composti sviluppato dall'Università degli studi di Urbino identificando due composti, il 1972esimo e il 1994esimo hanno dimostrato una buona affinità per il nostro target sia a livello energetiche che per il sito di interazione; pertanto, sono stati scelti per analisi più approfondite. Successivamente, attraverso l'approccio del *Docking Molecolare* sono state individuate le rispettive affinità di binding dell'inibitore i cui valori di ΔG servono per definire possibili divergenze tra le forme della MexY e soprattutto di come i singoli aminoacidi dell'inibitore interagiscono con le porzioni di proteina a cui si legano. Infine, attraverso l'approccio della *Dinamica Molecolare* è stato valutato il comportamento di questi composti dopo che hanno subito una risistemazione all'interno della tasca di binding in modo da valutare nuove interazioni o un possibile allontanamento dal sito di binding.

Attraverso l'analisi *in vitro*, valutando l'uso sinergico di Tobramicina ed inibitore, il ceppo PA7 di *Pseudomonas Aeruginosa* si è dimostrato il più stabile,

mentre risultati incoraggianti sono arrivati dal ceppo clinico NC04 in cui ci sono stati buoni cali dei valori di Concentrazione Minima Inibente (MIC).

1.2 Berberina e derivati

La berberina è un alcaloide isochinolinico in forma di sale d'ammonio quaternario presente in numerose piante del genere *Berberis*, come *Berberis vulgaris*, *Berberis aristata*, e altre varietà *Xanthorhiza simplicissima*, *Tinospora cordifolia*, *Argemone Mexicana*, *Coptis chinensis* ed è stata ampiamente utilizzata nel trattamento della diarrea batterica e della gastroenterite per lungo tempo. Di recente, è stato dimostrato che la berberina agisce in sinergia con alcune classi di antibiotici aumentandone la loro efficacia, inoltre è impiegata come antinfiammatorio ed è coinvolta anche nelle terapie anticancro². Tuttavia, la bassa biodisponibilità, la scarsa solubilità e la moderata affinità di legame agli acidi nucleici costituiscono una grave limitazione nel suo impiego^{3,4}.

Un altro derivato interessante e promettente è la diidroberberina (DHBER), la sua forma ridotta⁵. Attualmente, è un candidato farmaco per il trattamento del diabete di tipo 2^{6,7}, è in grado ridurre le dimensioni della placca aterosclerotica⁸, ha potenziale terapeutico per la distrofia miotonica di tipo I⁹, mostra proprietà antiradicali, revitalizzanti e antifibrotiche per applicazioni dermatologiche¹⁰ e manifesta un effetto sinergico con gli antibiotici¹¹.

Anche la sua forma completamente ridotta, chiamata tetraidroberberina (THBER)¹², è in grado di agire sul sistema nervoso centrale come inibitore, possiede effetti epatoprotettivi¹³, è impiegata nella protezione contro il danno da ischemia cerebrale e mostra attività antiaritmica. Inoltre, la THBER e i suoi derivati sono agenti antiossidanti efficaci^{14,15}.

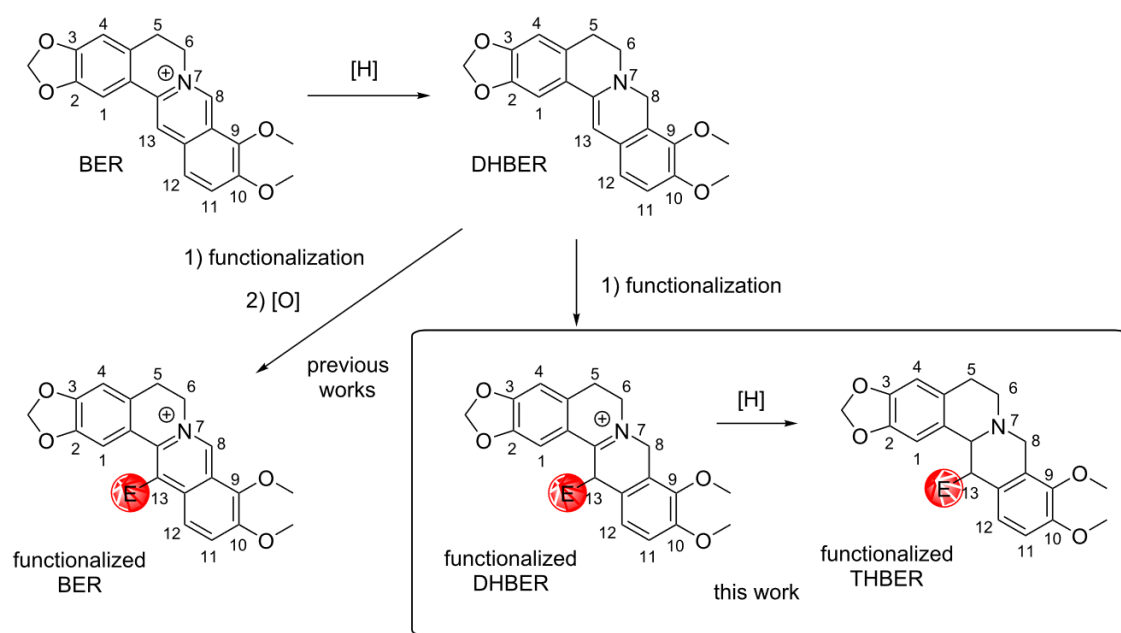


Fig. 1⁵ Schema che raffigura il processo di creazione e funzionalizzazione di DHBER e THBER.

Capitolo secondo

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

2.1 Informazioni generali

Pseudomonas aeruginosa è un batterio gram-negativo aerobio, bastoncellare, mobile, in grado di infettare eucarioti superiori, tra cui anche l'uomo. Cresce e sopravvive in moltissime nicchie ecologiche caratterizzate da elevatissima umidità¹⁶, inoltre, a causa delle sue scarse esigenze nutritive può essere isolato anche da lozioni, creme, dentifrici e liquidi per lenti a contatto. Per l'uomo si configura come patogeno opportunisto ed è in grado di infettare pazienti debilitati o immunocompromessi, soprattutto se ospedalizzati e recanti ferite profonde o ustioni, di conseguenza è collocato tra i patogeni ospedalieri più pericolosi¹⁷. È responsabile di infezioni respiratorie in pazienti sottoposti a ventilazione assistita¹⁸, urinarie nel caso in cui il paziente presenti uropatie ostruttive¹⁹, del sistema circolatorio causando batteremie¹⁹ ed è anche causa di follicolite ed osteomielite nel caso di profonde ferite o ustioni²⁰; il trattamento delle infezioni risulta difficile e spesso inefficace, grazie alla marcata tendenza del microorganismo di sviluppare antibiotico resistenza, di persistere alla presenza di elevate concentrazioni di antibiotico, normalmente letali, e di produrre biofilm²¹. Inoltre, a causa della sua capacità di conversione in ceppo mucoide²², è considerato la principale causa di morbidità e mortalità nei pazienti

affetti da fibrosi cistica, in cui l'infezione è caratterizzata dalla colonizzazione persistente dell'epitelio polmonare, favorita dalla marcata produzione di muco da parte del tessuto stesso²³. Anche non essendo classificato come principale colonizzatore polmonare, in quanto le infezioni acute sono più frequentemente sostenute da *Staphylococcus aureus* ed *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa* costituisce il principale responsabile delle infezioni croniche, spesso caratterizzate dalla resistenza alla maggior parte delle classi antibiotiche attualmente in commercio¹⁶, questo è dovuto alla presenza di una grandissima varietà di fattori di virulenza²⁴:

- Lipopolisaccaride (LPS): componente strutturale che protegge il foglietto esterno e danneggia le cellule ospiti. Il lipide A, la sua principale componente, causa l'attacco e il riconoscimento da parte dei recettori dell'ospite e provoca danni diffusi²⁵.
- Outer Membrane Proteins (OMPs): contribuiscono ad adesione, scambio di nutrienti e antibiotico resistenza²⁶.
- Sistema di secrezione di tipo 3 (T3SS), che può gravemente ostacolare la difesa dell'ospite attraverso l'iniezione di citotossine tra cui ExoU, ExoT, ExoS e ExoY, che influenzano l'ambiente intracellulare, in particolare bloccando la fagocitosi e la rimozione batterica²⁷.

- Esotossina A, può inibire la sintesi proteica dell'ospite attraverso un meccanismo di ADP-ribosilazione^{28,29}.
- Piocianina: danneggia i tessuti dell'ospite e compromette la funzione degli organi³⁰.
- Le elastasi LasA e LasB, la proteasi alcalina (AprA), le lipasi LipC, la fosfolipasi C e le esterasi A sono un gruppo di enzimi litici che modulano altri fattori di virulenza³¹.
- I siderofori come la Pioverdina, sono sistemi di assorbimento del ferro che aiutano la sopravvivenza batterica in ambienti privi di ferro³².
- Le catalasi (KatA, KatB e KatE), le idroperossido reduttasi e le superossido dismutasi neutralizzano l'attività delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) dei fagociti per evitare di essere eliminati³³.

Un'altra importantissima capacità è la produzione di biofilm, nello specifico un biofilm è un complesso di colonie batteriche che risiedono in una matrice di esopolisaccaridi, questo conferisce la capacità di svolgere le loro funzioni come se fossero un'unica entità, grazie a ciò sono anche in grado di comunicare attraverso il meccanismo del *quorum sensing*³⁴: i principali meccanismi descritti in questo microorganismo sono Las, Rhl, PQS³⁵. I biofilm possono formarsi su varie superfici che possono spaziare da superfici inanimate a superfici appartenenti ad altri microorganismi³⁶. Questo stile di vita è definito sessile e

conferisce protezione contro danni fisici, chimici e biologici³⁷. Nello specifico, *P. aeruginosa* produce tre tipi di esopolisaccaridi che sono Psl, Pel ed Alginato³⁸, quest'ultimo è responsabile nella formazione del fenotipo mucoide, responsabile, come detto in precedenza, dell'insorgenza della fibrosi cistica.

2.2 Antibiotico resistenze in *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas Aeruginosa è uno dei microorganismi più noti per aver sviluppato nel corso del tempo innumerevoli meccanismi di antibiotico resistenza, infatti troviamo moltissimi ceppi multi- e pan-resistenti. I meccanismi di resistenza sono di tipo cromosomico, extra-cromosomico, acquisito³⁹ e adattivo. La resistenza acquisita si verifica a causa di mutazioni o dall'acquisizione di elementi genetici come plasmidi, trasposoni e integroni^{40,41}. La resistenza adattativa è di più recente caratterizzazione: include resistenza mediata dal biofilm e l'abilità di formare *persistenter cells* tolleranti a molti farmaci ed è responsabile di recidiva e riacutizzazione di molte infezioni⁴².

Alcuni esempi di resistenza cromosomica acquisita da elementi trasponibili:

- mutazioni nei geni *parA*, *parC* e *gyrA*, che ostacolano il legame dei fluorochinoloni a livello della Topoisomerasi IV e della DNA girasi, determinando la modificazione del target terapeutico⁴³.

- Mutazioni a livello dei loci dei geni repressori mexR, nalB, nalD, regolatori dell'espressione del sistema MexAB-OprM, causano una sua iper-espressione⁴⁴.
- Mutazioni nei geni regolatori per l'espressione di vari enzimi (AmpC) o pompe di efflusso che comportano un elevato livello di sintesi proteica⁴⁵.

Esempio di resistenza adattiva:

- Pompa di efflusso MexXY-OprM che causa la resistenza agli aminoglicosidi⁴⁶.

2.3 Antibiotico resistenza efflusso-mediata

I meccanismi di resistenza efflusso-mediata si dividono in meccanismi *drug specific* e meccanismi *multidrug*. I meccanismi di efflusso multidrug sono ampiamente conservati nei batteri, geni codificanti questi sistemi di efflusso sono quasi sempre presenti all'interno del genoma di un batterio e la loro espressione in molti casi è il risultato di mutazioni in geni regolatori. Al contrario, i meccanismi di efflusso drug specific sono generalmente codificati da plasmidi e/o altri elementi genetici mobili (trasposoni, integroni) che portano geni di resistenza aggiuntivi⁴⁷. Questi meccanismi sono stati descritti per la prima volta in *Escherichia Coli*^{48,49} e successivamente sono stati scoperti in

quasi tutti i batteri fino ad essere classificati tra i primi meccanismi responsabili di antibiotico resistenza.

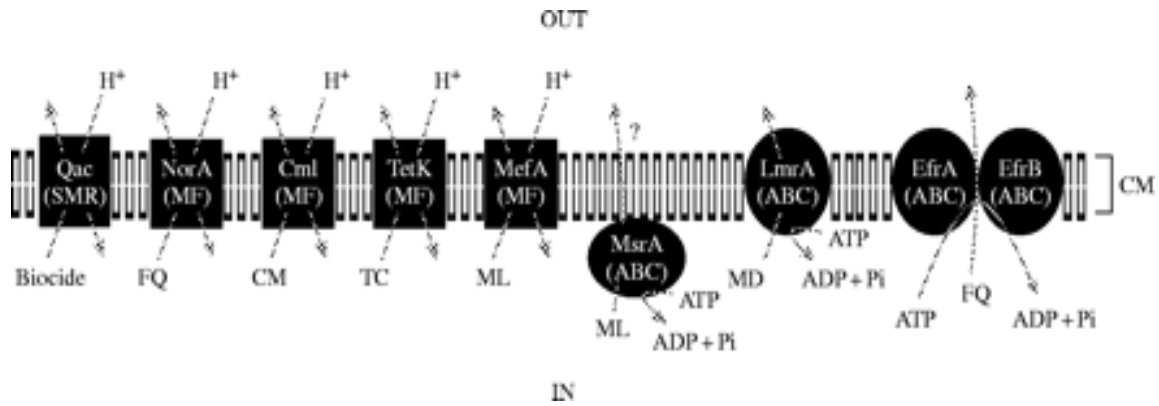


Fig. 2 Schema raffigurante i principali meccanismi di antibiotico resistenza efflusso-mediata nei Gram-positivi.

Capitolo terzo

POMPE DI EFFLUSSO

3.1 Suddivisione delle pompe di efflusso

Le pompe di efflusso sono complessi proteici situati all'interno degli involucri delle cellule batteriche con lo scopo di espellere varie tipologie di composti come sostanze tossiche, antibiotici (sono associate alla MDR⁵⁰) o molecole segnale, dall'interno della cellula direttamente nell'ambiente esterno. Risultano essere delle componenti strutturali spesso intrinseche e costituiscono uno dei principali meccanismi di difesa dei microorganismi. Evidenze confermano che nei batteri con genomi più grandi è presente un numero maggiore di pompe di efflusso⁵¹.

Classificazione delle varie tipologie di pompe di efflusso:

- ABC (ATP-binding cassette superfamily)
- MATE (multidrug and toxic compound extrusion)
- RND (resistant and nodulation division family)
- SMR (small multidrug resistance)
- MFS (major facilitator superfamily)

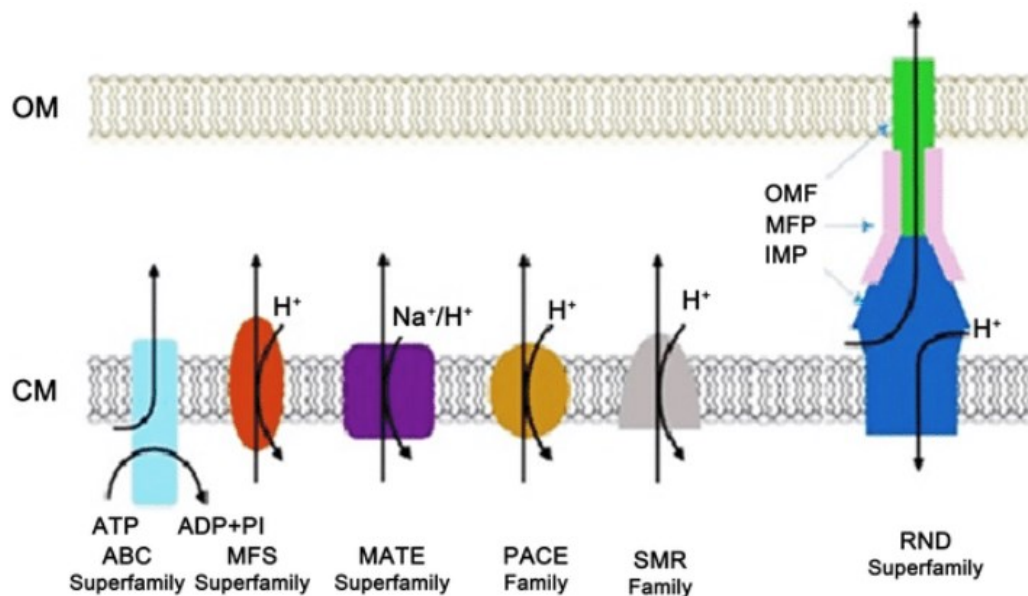


Fig. 3 Schematizzazione delle principali pompe di efflusso⁵²

I meccanismi di funzionamento di queste pompe sono differenti: MFS, RND ed SMR ricavano l'energia necessaria ad espellere un farmaco dalla cellula attraverso la forza proton-motrice generata da un sistema antiporto protone-farmaco⁵³, MATE utilizza un sistema che scambia un protone con uno ione sodio, mentre ABC sfrutta l'idrolisi dell'ATP⁵⁰. Le pompe che caratterizzano i batteri gram-positivi sono solitamente composte da un singolo trasportatore localizzato all'interno della membrana. Le pompe dei gram-negativi sono più complesse a causa della membrana esterna di questi batteri, nello specifico, vanno a formare un canale proteico tripartito che richiede l'ausilio di una proteina di fusione di membrana (MFP) e una proteina di efflusso della membrana esterna (OEP), il tutto va a coordinarsi con un trasportatore situato

all'interno della membrana citoplasmatica. Un microorganismo può esprimere più di una pompa di efflusso e la sua espressione può essere costitutiva ma anche indotta dalla presenza di un substrato. Ad esempio, *P. aeruginosa* esprime costitutivamente la pompa MexAB-OprM, una pompa RND considerata la principale di questo microorganismo⁵⁴. Sempre in quest'ultimo è presente anche una pompa inducibile, la MexXY-OprM, indotta dalla presenza di aminoglicosidi⁵⁵ ed è una dei responsabili del complesso meccanismo di antibiotico resistenza di *P. aeruginosa*. L'attività di queste pompe inducibili è regolata da due geni: *mexZ* e *mexR*, le cui mutazioni portano ad una over-espressione della pompa⁵⁵: tale meccanismo non è l'unico responsabile dell'antibiotico resistenza, ma può coordinarsi con altri EP e meccanismi di resistenza.

3.2 Struttura di MexXY-OprM

La struttura completamente risolta di questa proteina non è ancora disponibile nelle banche dati proteiche, perciò nel nostro laboratorio è stato costruito in silico un modello ad alta risoluzione di MexY nella sua associazione trimerica utilizzando le strutture di AcrB e MexB (2v50)⁵⁶ come template tridimensionali. Il modello ottenuto è stato stabilizzato nella membrana citoplasmatica batterica utilizzando simulazioni di dinamica molecolare (MD) atomistiche⁵⁷.

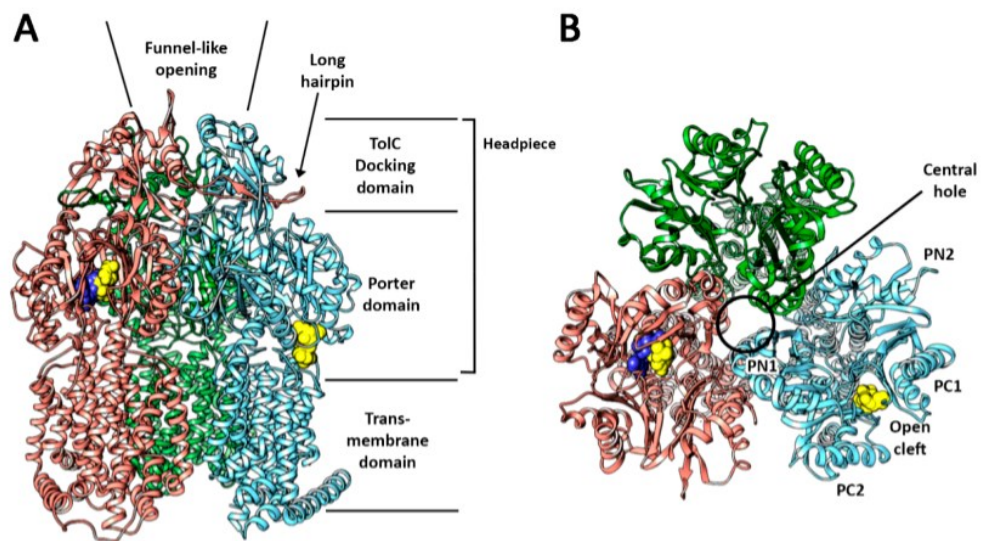


Fig. 4.1A *Struttura trimerica di MexXY-OprM*

Fig. 4.1B *Struttura trimerica vista dall'alto di MexXY-OprM*

(Figure prese da Laudadio, E. et al. *Natural Alkaloid Berberine Activity against Pseudomonas aeruginosa MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance: In Silico and in Vitro Studies*)⁵⁷

Ogni monomero è suddiviso in un macrodominio trans membrana e in uno periplasmatico. Il dominio trans membrana è costituito da 12 α -eliche e si connette a quello periplasmatico con due grossi loop che partono dalle eliche TM1, TM2, TM7 e TM8. Oltre a queste strutture possiede anche un dominio porter (PD) e un dominio TolC. PD è composto da quattro sub domini denominati PC1, PC2, PN1 e PN2 (Fig. 3.2) che costituiscono il pore domain, a livello di questi domini sono situati l'*access pocket* o sito accessorio (AP) e il *deep binding pocket* (DBP); a livello di PC2 è presente anche il sito di *cleft* o allosterico (ALP)¹. Il dominio TolC

contiene DC e DN, due sub-domini affiancati ad una β -hairpin (Fig. 3.2). Queste tre strutture sfruttano un sistema ad incastro in modo che ogni monomero si incastra al suo adiacente in modo da formare un trimero stabile⁵⁸.

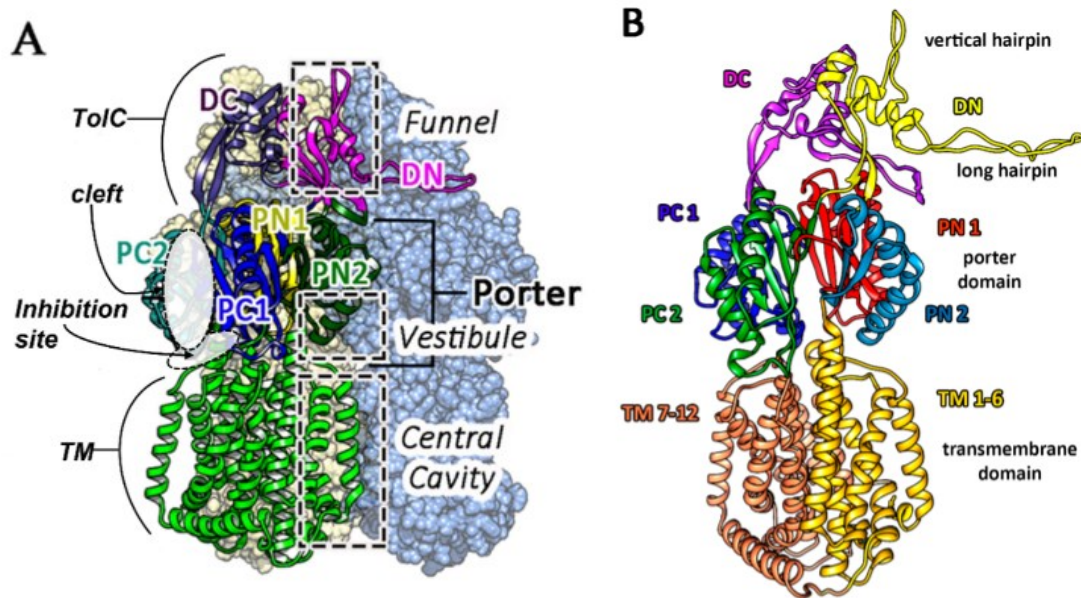


Fig. 4.2 A/B Localizzazione delle regioni PN1, PN2, PC1, PC2, DC e DN
(Laudadio, E. et al. Natural Alkaloid Berberine Activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance: In Silico and in Vitro Studies)⁵⁷

OprM è una outer membrane protein, nello specifico è un omo-trimero formato da un due α -eliche (dominio periplasmatico) e un dominio OM a β -barrel e rappresenta il poro che consente l'estrusione del substrato verso l'esterno della cellula^{59,60}.

3.3 Schema di funzionamento

Lo scopo principale di questa proteina è conferire la resistenza agli aminoglicosidi, come ad esempio la tobramicina. Dall'analisi strutturale è emerso che il sito responsabile del legame con il farmaco è il sito *cleft* o allosterico⁶¹. Il percorso di estrusione del substrato è caratterizzato da una rotazione funzionale e da un cambio conformazionale ciclico in ciascun protomero dell'omotrimero e comprende tre steps: accesso, legame ed estrusione del substrato⁶². Il dominio PD di ciascun protomero racchiude due tasche di legame per il substrato, quella di accesso o prossimale (AP, *access pocket*) e quella di legame o distante (DP, *distant pocket*). Entrambe sono coinvolte nella traslocazione dei ligandi attraverso un movimento peristaltico. Questi due siti di legame sono separati da una G-loop che regola il passaggio tra queste due tasche. Quando la proteina è in conformazione *loose* (L), forma una tasca di accesso più grande in modo da accogliere il substrato il più correttamente possibile. Quando è in *tight* (T) fa in modo che il substrato passi nella tasca distale, questo avviene perché il cambiamento conformazionale causa un ingrandimento della tasca distale e una diminuzione della tasca di accesso. Infine, quando è in conformazione *open* (O), consentirà l'estrusione del substrato verso l'ambiente extracellulare⁶³. *“Il canale interno di MexY è caratterizzato da estesi polimorfismi sequenziali, che possono influenzare le modalità di legame dei substrati e degli inibitori della pompa di efflusso (EPIs).*

Questi polimorfismi possono spiegare le differenze nella capacità di MexY di espellere gli EPIs e lo studio dell'affinità di legame in diverse varianti batteriche può aiutare a identificare nuove molecole da utilizzare come efficienti EPIs."⁵⁸.

Access Pocket (AP)	Deep Binding Pocket (DBP)	Allosteric pocket (ALP)
K79, T90, M133, K291, S134, S619, M570, M572, M574, M661, N662, S663, L669, S671, M676, T657, M711, A713, Q840	S46, K79, S88, Y127, M133, I135, I138, S272, E273, K291, M570, M574, Y605, F623, M661, N662, S663, L669, D676	F560, L561, P562, E563, E564, S611, P665, P664, L666, S673, G674, F675, E822, Q824, Q856, S831, Q824, A825, A834, S830, E833

Fig. 5¹. *Tabella raffigurante la composizione amminoacidica di sito accessorio (AP), deep binding pocket (DBP) e sito allosterico o cleft (ALP).*

3.4 Riconoscimento del substrato

Il substrato è generalmente riconosciuto dalla proteina attraverso tre sistemi differenti:

- *Induced-fit*: le catene laterali si adattano in modo da “indurre” la modifica della taglia della tasca di binding⁶⁴.
- *Multi-site binding*: sfrutta la capacità della tasca di binding di avere affinità per più substrati, di conseguenza modifica la

sua struttura in modo da accogliere quel determinato substrato presente in quel momento.

- *Ipotesi di oscillazione del substrato*: nel caso in cui il substrato è di grandi dimensioni, questo oscillerà all'interno della tasca di binding cercando di trovare il miglior orientamento possibile.⁶⁵

3.5 EPIs (*efflux pump inhibitors*)

Gli EPIs (*efflux pump inhibitors*) sono degli agenti terapeutici di origine sia naturale che sintetica in grado di rinnovare l'attività di antibiotici che avevano ormai perso la loro attività a causa di antibiotico resistenze efflusso-mediate sviluppate da vari ceppi batterici⁶⁶. Un EPI deve esclusivamente possedere la capacità di inibire le pompe di efflusso, non deve possedere attività antimicrobica intrinseca, in quanto l'assenza di un effetto tossico per i microrganismi limita la possibilità che questi possano sviluppare insensibilità al composto stesso, e, infine, non deve interagire con altri target batterici. Il meccanismo di inibizione può essere competitivo o meno; nel primo caso, l'inibitore lega lo stesso sito a cui si sarebbe dovuto legare l'antibiotico, in questo modo il farmaco resta confinato nell'ambiente intracellulare e non viene più espulso dal patogeno; nel secondo, la natura dell'inibizione è legata a fenomeni di ingombro sterico o del blocco di cambiamenti conformazionali coinvolti nella dinamica dell'efflusso stesso⁶⁷.

Alcuni tra i più conosciuti EPIs caratterizzati sono⁶⁸:

- Phe-Arg β -naftalimide (Pa β N), una molecola specifica nei confronti della pompa MexAB-OprM di *Pseudomonas Aeruginosa* e anche molto efficace in sinergia con β -lattamici e fluorichinoloni. Dopo vari approfondimenti il suo utilizzo è stato abbandonato vista la sua elevata tossicità nei confronti delle cellule umane.
- 1-(1-naftilmetil) – piperazina (NMP), un inibitore di pompe NRD famose per conferire varie antibiotico resistenze a batteri Gram-negativi.
- Carbonile-3-clorofenildrazone (CCCP), un inibitore aspecifico avente come bersaglio le membrane batteriche. Purtroppo anch'essa è risultata tossica ed inoltre è stata scoperta responsabile dell'induzione cellulare verso lo stato di *persisters cells*, andando così a conferire loro resistenze a vari composti con attività antibiotica⁶⁹.
- Reserpina e Verapamil: sono responsabili del blocco del trasporto vescicolare delle monoamine e dell'ingresso del calcio transmembrana. Il Verapamil, nello specifico, blocca le pompe MDR di cellule tumorali e microorganismi patogeni, inoltre migliora anche l'attività della Tobramicina. La Reserpina blocca l'attività di Bmr e NorA, pompe di efflusso presenti nei Gram-positivi⁷⁰. Tuttavia, le concentrazioni necessarie a bloccare l'attività delle componenti appena viste sono neurotossiche⁷¹.

- Berberina, oggetto di studio di questa tesi, in sinergia con antibiotici aminoglicosidici come la Tobramicina, funge da inibitore della resistenza efflusso mediata da parte della pompa di efflusso MexXY-OprM.
- Piridopirimidine (D13-9001)
- Piranopirimidine (MBX)

Gli inibitori piridopirimidinici e piranopiridinici si legano entrambi a una specifica "*hydrophobic trap*" nel DBP del protomero T di AcrB asimmetrico. Questo legame impedisce l'associazione del substrato o blocca la transizione da T (tight) a O (open), essenziale per il ciclo catalitico funzionale della pompa RND⁷².

Capitolo quarto

MATERIALI E METODI

4.1 Docking molecolare

Il docking molecolare è una tecnica computazionale che permette di studiare l'interazione tra due molecole quali acidi nucleici, farmaci e proteine. Per effettuarlo occorre conoscere la struttura tridimensionale del target macromolecolare che può essere ottenuta tramite:

- Cristallografia a raggi X
- Risonanza magnetica nucleare (NMR)
- Costruzione mediante tecniche di modellistica molecolare (*homology modeling*) o mediante metodi *ab initio* (*Alphaphold*, un software in grado di sfruttare IA e Deep Learning).

Per studiare il docking è necessario modellizzare le interazioni fondamentali tra i costituenti atomici delle molecole. Queste interazioni sono approssimate in modo adeguato da potenziali di interazione classici (interazioni elettrostatiche, di volume escluso, nonché intramolecolari). Tali potenziali sono utilizzati anche per studiare l'evoluzione temporale delle molecole⁷³.

Esistono diversi modelli di docking molecolare:

- Rigid protein docking: non prevede modificazioni nella struttura della proteina, assumendo che le proteine siano rigide
- Partial protein flexibility: prevede la flessibilità di alcuni residui importanti nel legame
- Full protein flexibility: vengono presi in esame tutti i possibili movimenti, ha un elevato costo computazionale

I metodi si dividono in manuali e automatici:

- Manuale: all'interno della cavità l'operatore posiziona il ligando manualmente sfruttando una grafica computerizzata, basandosi su un'ipotesi riguardante l'eventuale modalità d'interazione. A questo punto si procede simulando l'associazione tra le due molecole. Il ligando va costruito, analizzato conformazionalmente e ne va scelta la conformazione sterica adeguata, va orientato all'interno della struttura e viene ottimizzato il complesso che deriva dall'associazione delle due molecole.
- Automatico: le operazioni sopra sono rese automatiche. Per valutare la bontà di questa metodica viene utilizzato lo scoring, che va a valutare l'associazione tra le 2 molecole. Lo score è un valore numerico che

permette di stabilire a priori, cioè senza l'ausilio della grafica, se un orientamento è apprezzabile o meno. L'operatore sarà comunque tenuto a scegliere tra vari complessi con diversi score e diverse conformazioni.

Score: è l'elemento più importante del docking, permette di valutare la complementarità ligando-recettore e tiene conto di tanti fattori:

$$\text{Score} = C_s + C_i + E_{NB} + E_{Des} + \dots$$

C_s	= complementarità sterica;
C_i	= contributo idrofobico;
E_{NB}	= energia di non legame;
E_{Des}	= energia di desolvatazione.

4.1.1 Autodock

Autodock è un software in grado di eseguire il processo di docking automatico. È progettato in modo da prevedere come piccole molecole, come substrati o candidati farmacologici riescano a legarsi ad un recettore avente una struttura tridimensionale già risolta mediante i metodi visti in precedenza. Impostando un docking, bisogna cercare di trovare il minimo globale dell'energia di interazione tra proteina e substrato esplorando tutti i gradi di libertà (DOF). Questo processo è stato impostato semplificando la procedura all'intero di questo software basandosi su una metodologia che ha come punti chiave la valutazione energetica *rapid-grid based* e una efficiente ricerca della libertà torsionale⁷⁴. Autodock

integra i metodi di Monte Carlo, algoritmi genetici (GA) evolutivi e Lamarckiani per rendere flessibile il ligando e rigido il recettore, questi algoritmi considerano le conformazioni come se fossero codificate da geni e le loro variazioni sono influenzate da ipotetiche mutazioni o da fenomeni di crossing-over, in questo modo nascono nuove posizioni per il ligando preso in esame⁷⁵. Lo scoring è basato sul campo di forza AMBER che include interazioni di Van der Waals, legami a idrogeno, interazioni elettrostatiche, entropia conformazionale ed energia di desolvatazione. Ciascun termine è integrato attraverso l'utilizzo di un sistema di *scaling* ottenuto da dati sperimentali⁷⁶. Il processo di docking inizia con il caricamento dei file del ligando e del recettore, successivamente, prima di determinarne le varie pose di legame, è necessario settare il GRID box, una mappa che definisce le zone del recettore che sono compatibili a livello di potenziale elettrostatico con il ligando. Nel mio caso, il GRID box si estendeva nella regione centrale della pompa di efflusso in modo da andare a racchiudere con certezza il sito allosterico, in questo caso si parla di *blind docking* perché le regioni di calcolo ed interazione sono molto estese e si cercano tutti i siti possibili di interazione sulla superficie proteica. Successivamente, una volta determinate le pose in *blind*, sono andato ad effettuare un'analisi più accurata della zona di interazione attraverso il *focused docking*, in questo caso il GRID box è molto più piccolo e centrato sul ligando, in questo modo è possibile una rifinitura della posa del

binding sia in termini energetici che strutturali. Infine, come detto prima, la classificazione delle pose avviene secondo uno score (in questo caso energia libera del binding) e, nello specifico, le conformazioni-pose vengono organizzate in clusters sulla base della zona di interazione e RMSD del ligando; all'interno dei vari clusters si troveranno tutte le conformazioni classificate con score e popolazioni relative. Nel mio lavoro di tesi ho utilizzato come recettore la pompa MexXY-OprM dei ceppi di *Pseudomonas Aeruginosa* PA7 (ceppo di laboratorio resistente per MexY) AR48, AR86, C15 ed NC04 (ceppi clinici). I ligandi utilizzati sono stati i derivati della Berberina numero 1972 (R ed S) e numero 1994 (R ed S) provenienti dal database dei suoi analoghi proveniente dalla libreria sintetica del gruppo del Prof. Mantellini dall'Università degli Studi di Urbino.

4.2 Virtual Screening

Il Virtual Screening (VS) è una tecnica in grado di identificare molecole candidate come punti di partenza per la chimica farmaceutica⁷⁷. Le principali tecniche di Virtual Screening sono classificate in due macro-categorie: *ligand-based virtual screening (LBVS)* e *structure-based virtual screening (SBVS)*⁷⁸. Il metodo LBVS più conosciuto è il virtual screening basato sul farmacoforo (PBVS) o modello farmacoforico. Il farmacoforo è una descrizione astratta di una molecola biologicamente attiva che possiede le caratteristiche necessarie, basate sulla sua attività biologica, per essere considerata un farmaco⁷⁹. Un modello farmacoforico

è generato utilizzando un approccio basato sul ligando in cui è essenziale possedere almeno una molecola attiva, denominata *query* ed un database di ricerca; in alternativa è utilizzato un database contenenti tutte molecole attive⁸⁰. Per eseguire questo VS, vengono presi in considerazione solamente tratti chimici comuni tra tutte le molecole presenti nel database, come ad esempio, quelle porzioni di molecola che sono considerate rilevanti per l'interazione tra recettore e ligando. Il processo di PBVS comprende due fasi principali: la creazione di uno spazio conformazionale per i ligandi nel set di addestramento in modo da poter illustrare la flessibilità associata alla conformazione dei ligandi e l'allineamento di diversi ligandi per individuare le caratteristiche chimiche fondamentali per generare il farmacoforo⁸¹. Tra i metodi di SBVS più utilizzati c'è il *docking-based virtual screening* (DBVS) che sfrutta la capacità di un programma di docking di gestire un gran numero di composti e classificarli sulla base dell'energia di legame/punteggio in modo automatizzato. Il processo tiene conto principalmente della dimensione del database, il sistema di scoring e la potenza computazionale⁷⁸. Questo metodo è anche quello che ho utilizzato io nell'individuare i composti analoghi della Berberina; nello specifico ho eseguito il VS in triplicato prendendo in considerazione prima i migliori 50 composti ottenuti dal database e successivamente ho effettuato un'ulteriore scrematura considerando solo i migliori 10 composti.

4.2.1 Openbabel

Openbabel è un software open-source che permette di cercare, convertire, analizzare o archiviare dati ottenuti attraverso il modeling molecolare. Riesce a fare ciò attraverso l'integrazione di numerosi linguaggi di programmazione⁸². Ho usato questo software per convertire i files del database utilizzato dal formato (*PDB*) al formato (*MOL2*).

4.2.2 Raccoon⁸³

Raccoon è una interfaccia grafica di Autodock in grado di operare virtual screening. Il suo scopo è quello di eseguire automaticamente tutti i vari processi computazionali che si susseguono durante un virtual screening:

- Processare librerie di ligandi
- Dividere file multi-strutturali (*MOL2*)
- Generare file di input (*PDBQT*)
- Generare varie conformazioni del recettore
- Rendere flessibili i residui
- Filtrare le varie tipologie di ligandi
- Generare file di configurazione per *AutoGrid* e *AutoDock*
- Generare scripts per lanciare dei virtual screening

4.2.3 ChemDraw⁸⁴

ChemDraw è un software di disegno molecolare che consente di costruire da zero strutture chimiche. Possiede *presets* di strutture classiche come anelli, legami, catene, atomi e gruppi funzionali, inoltre include calcolatori di proprietà, modelli di attrezzature chimiche e attrezzature di laboratorio così come strumenti di disegno per piastra TLC gel per elettroforesi. Versioni più avanzate consentono anche la predizione NMR e permettono anche di interrogare basi di dati online, esplorare, organizzare ed elaborare dati strutturali.

4.3 Minimizzazione dell'energia⁸⁵

Una molecola tende naturalmente ad assumere la conformazione in cui l'energia è il più bassa possibile. Spesso, queste molecole sono sistemi quantomeccanici che rispondono alle leggi della fisica quantistica e spesso sono di grandi dimensioni (come proteine), per questo ci si serve della meccanica molecolare in modo da trattare queste molecole con metodologie descritte mediante le leggi della fisica classica. Le metodologie di meccanica molecolare si basano sull'utilizzo di funzioni empiriche che contengono parametri; tutti i parametri vanno a formare un *force field* (campo di forza) che descrive l'energia di un sistema chimico in base alle coordinate di tutti i suoi atomi disposti nello spazio. Utilizzando un campo di forza, quindi, l'energia diventa una funzione analitica delle coordinate interne, cioè della conformazione, indicata come $E(R)$. È

possibile trovare il punto in cui questa funzione raggiunge il suo minimo, determinando sia il valore minimo di R che di E . Questo processo viene eseguito attraverso un metodo iterativo che richiede la conoscenza della derivata seconda di $E(R)$: si raggiunge un minimo quando questa derivata è uguale a zero. L'aspetto fondamentale è che la conformazione risultante dalla minimizzazione è il punto di minimo relativo più vicino alla conformazione di partenza. In situazioni semplici si può arrivare alla conformazione corrispondente al minimo attraverso "semplici" processi di ricerca conformazionale. Nel caso di sistemi complessi, come le proteine, non c'è un metodo efficace al 100% in grado di determinare la conformazione preferenziale conoscendo solamente la sua sequenza. Il protocollo utilizzato per eseguire la minimizzazione consiste in 5000 steps di steepest descent e conjugate gradient. Questo ha reso possibile discernere correttamente tra tutte le buche di minimo locale ed arrivare ad identificare il minimo globale della superficie di energia potenziale.

4.3.1 GaussView/G16⁸⁶

GaussView è un'interfaccia grafica utilizzata con *Gaussian software per il calcolo computazione quantistico delle geometrie ed energie molecolari*. Nel nostro caso è stata utilizzata la versione G16. Aiuta nella creazione di file di input per *Gaussian*, consente all'utente di eseguire calcoli da un'interfaccia grafica senza la necessità di utilizzare istruzioni da linea di comando e assiste

nell'interpretazione dell'output di *Gaussian* (ad esempio, è possibile utilizzarlo per tracciare proprietà, animare vibrazioni, visualizzare spettri calcolati, ecc.).

4.4 Dinamica molecolare⁸⁵

Tornando al concetto di $E(R)$, è possibile studiare il movimento di nuclei che porta allo spostamento da una conformazione ad un'altra. I nuclei, essendo particelle con una massa considerevole rispetto agli elettroni, il processo può essere effettuato utilizzando metodi derivanti dalla fisica classica. I movimenti, però, essendo molto rapidi, per essere identificati al meglio, richiedono ingenti potenze di calcolo per riuscire a simulare (in nanosecondi) il movimento molecolare. La dinamica può essere utile per:

- Ricerche conformazionali
- Studiare il comportamento di molecole flessibili come loops delle proteine
- produrre strutture tridimensionali in accordo con i dati derivanti da NMR (*simulated annealing*)
- Calcolare le energie libere di binding
- Testare la posizione di molecole disposte sulla superficie di catalizzatori

Esistono diverse metodologie per eseguire una dinamica molecolare e la scelta della metodologia più adeguata dipende dalla funzione energetica più

appropriata per descrivere interazione intermolecolari e intramolecolari. Nella dinamica molecolare classica sono usati metodi di meccanica molecolare considerando il movimento degli atomi solo dal punto di vista nucleare attraverso l'approssimazione di Born-Oppenheimer. Per studiare altri sistemi biologici più complessi contenenti proteine che fungono da recettore e ligandi, sono stati sviluppati campi di forza con una parametrizzazione più opportuna come il CHARMM22, questo è stato parametrizzato separatamente per consentire lo studio, anche singolo, di proteine, acidi nucleici, lipidi e carboidrati⁸⁷.

4.4.1 CHARMM-GUI⁸⁸

CHARMM è un'interfaccia grafica ad uso accademico utilizzato per elaborare input per simulazioni di meccanica e dinamica molecolare, è provvisto di strumenti di analisi e manipolazione delle coordinate atomiche e delle traiettorie dinamiche. CHARMM-GUI è stato sviluppato per fornire un'interfaccia utente *web-based* per generare file di input e sistemi molecolari. Questo ha permesso di racchiudere in un'unica piattaforma, semplificare e standardizzare l'uso di tecniche di simulazione comuni e avanzate in CHARMM. L'ambiente web offre una piattaforma ideale per costruire e convalidare un sistema modello molecolare in modo interattivo. Il grande vantaggio è anche rappresentato dal

fatto che, durante l'ispezione visiva, se viene riscontrato un problema, è possibile tornare alla configurazione precedente e rigenerare l'intero sistema.

4.4.2 GROMACS⁸⁹

GROMACS è un software estremamente veloce dedicato alla simulazione di dinamica molecolare. Pur non avendo un proprio campo di forza, è compatibile con i principali campi di forza come CHARMM, GROMOS, OPLS, AMBER e ENCAD. Il programma supporta modelli di shell polarizzabili e vincoli dinamici. La sua flessibilità consente agli utenti di integrare nuove routine di forza, specificare funzioni tabulate e personalizzare facilmente le analisi. Inoltre, GROMACS include funzionalità per la dinamica fuori dall'equilibrio e per la determinazione dell'energia libera. Offre anche interfacce per la simulazione combinata MM/QM con pacchetti di chimica quantistica come MOPAC, GAMES-UK e GAUSSIAN. Il pacchetto include un'ampia gamma di circa 100 programmi per utility e analisi.

4.4.3 *g_mmpbsa*⁹⁰

g_mmpbsa è un software open source sviluppato utilizzando GROMACS e APBS e presenta un'interfaccia utente simile agli altri strumenti di GROMACS. Questo strumento calcola le componenti dell'energia di legame tramite il metodo MM-PBSA, escluso il termine entropico, e determina il contributo energetico di

ciascun residuo al legame mediante uno schema di decomposizione energetica. L'output generato dallo strumento viene poi utilizzato come input negli script Python inclusi nel pacchetto, per ottenere l'energia di legame finale e il contributo energetico di ogni residuo.

4.5 Prove microbiologiche in vitro

Queste prove microbiologiche sono state effettuate dal laboratorio di Microbiologia della Prof.ssa Carla Vignaroli all'interno del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche. I ceppi sono conservati in forma congelata a -80°C in brodo LB con l'aggiunta del 20% di glicerolo. Per la coltivazione, i ceppi sono stati seminati su piastre di agar LB o su agar selettivo per *Pseudomonas*, mentre il test di sensibilità è stato condotto in brodo Muller Hinton Broth II (MHII). Tutti i terreni di coltura sono forniti da Liofilchem S.r.l., preparati secondo le indicazioni del produttore e sterilizzati in autoclave a 121°C per 15 minuti. La tobramicina è stata acquistata da SigmaAldrich (Saint Louis, Missouri, USA). I sei candidati EPI (2F, 3F, 2G, 3G, 2H, 3H) sono stati sintetizzati dal team del Prof. Mantellini presso l'Università di Urbino e conservati come soluzioni stock in DMSO a 20 mg/ml.

La determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC) è stata effettuata seguendo il metodo di microdiluzione in piastre microtiter da 96 pozzetti, in conformità con le linee guida del CLSI, utilizzando concentrazioni scalari di

tobramicina tra 0,125 e 256 µg/ml. Come controllo è stato utilizzato il ceppo *P. aeruginosa* ATCC 27853, mentre sono stati impiegati un ceppo con MexY eliminato e un altro con un plasmide per ripristinare la sua espressione. L'attività antibatterica dei singoli composti è stata valutata tramite microdiluizione in brodo, con concentrazioni variabili da 0,5 a 320 µg/ml. È stata prestata attenzione all'aggiunta corretta di DMSO per mantenere una concentrazione costante dell'1,6% in ogni pozzetto. Il test della griglia è stato condotto in piastre microtiter da 96 pozzetti, con concentrazioni scalari di tobramicina tra 256 µg/ml e 0,06 µg/ml e i sei composti tra 320 µg/ml e 10 µg/ml.

Capitolo quinto

RISULTATI DEL VIRTUAL SCREENING

5.1 Risultati dalla libreria di composti dall'Università di Urbino

Ho eseguito un Virtual Screening in triplicato partendo da una libreria di composti analoghi della berberina sintetici del laboratorio del Prof. Mantellini dell'Università di Urbino; la libreria comprende 2022 composti.

Il protocollo computazionale utilizzato è riportato di seguito:

- Generazione attraverso il software *Openbabel* delle coordinate 3D di ogni composto in formato MOL2 dal formato SDF.
- Conversione in PDBQT ogni file MOL2.
- Verifica tramite Raccoon che i file prodotti non fossero danneggiati.
- Aggiunta del percorso corrispondente al file in PDBQT della proteina recettore (PA7) all'interno dello script necessario per eseguire il Virtual Screening e settaggio dei parametri e delle coordinate:

x 21.4

y 72.469

z 117,812

Spacing 1.000

- Lancio del Virtual Screening da riga di comando.

Terminato il processo, ho selezionato i migliori 50 composti di ogni sessione di Virtual Screening in termini di energia di binding.

Successivamente, ho visionato la posizione di ogni ligando all'interno del recettore basandomi sui vari siti di legame identificati in altri studi(riferimenti): sito Allosterico, sito Accessorio e Deep Binding Pocket ed indicato con "Altro" pose di legame differenti.

Ho racchiuso in una tabella tutti i migliori composti indicando da quale Virtual Screening provenissero (VS1, VS2, VS3), le loro energia di binding corrispondente e il sito di legame:

<i>CODICE</i>	<i>nHTVS</i>	<i>ENERGIA DI LEGAME</i>	<i>SITO DI INTERAZIONE</i>
1236	VS1, VS2, VS3	-11.8, -11.0, -10.4	Altro
1725	VS1, VS2, VS3	-11.8, -11.5, -10.9	Deep Binding Pocket, Allosterico

1977	VS1, VS2, VS3	-11.1, -11.7, -10.8	Deep Binding Pocket, Allosterico , Altro
1990	VS1, VS3	-11.6, -11,5	Altro
1469	VS1, VS3	-11.1, -11.6	Altro
1985	VS1, VS3	-11.6, -10.6	Deep Binding Pocket, Allosterico
1243	VS2	-11.5	Deep Binding Pocket
1978	VS2	-11.5	Deep Binding Pocket
1576	VS1, VS2, VS3	-11.5, -10.5, -10.5	Deep Binding Pocket, Allosterico
1222	VS1, VS2, VS3	-11.1, -11.4, -11.4	Allosterico
1241	VS1, VS2, VS3	-10.4, -11.4, -10.2	Altro, Deep Binding Pocket
276	VS1, VS3	-11.2, -10.5	Altro
1992	VS1	-11.2	Altro
1234	VS1, VS2, VS3	-10.9, -10.4, -11.2	Altro, Deep Binding Pocket

1980	VS1, VS2	-11.2, -10.4	Deep Binding Pocket
187	VS1, VS2, VS3	-10.9, -11.2, -11.2	Deep Binding Pocket
1988	VS2, VS3	-11.2, -10.2	Deep Binding Pocket, Altro
1972	VS2	-11.1	Allosterico
278	VS1, VS3	-10.3, -11.1	Altro
1223	VS1, VS2, VS3	-11.1, -11.0, -11.1	Deep Binding Pocket, Allosterico
1974	VS1	-11.0	Allosterico
1995	VS1, VS2	-11.0, -10.7	Altro
666	VS1, VS2	-11.0	Deep Binding Pocket
1315	VS2	-11.0	Deep Binding Pocket
1984	VS1, VS2	-10.9	Deep Binding Pocket
1983	VS1, VS2, VS3	-10.9, -10.9, -10.8	Deep Binding Pocket

1126	VS1, VS2	-10.8, -10.9	Deep Binding Pocket
1973	VS1, VS3	-10.7, -10.9	Deep Binding Pocket
1726	VS2, VS3	-10.3, -10.9	Altro, Deep Binding Pocket
1994	VS1, VS2, VS3	-10.3, -10.6, -10.8	Allosterico , Altro
441	VS1, VS2, VS3	-10.8, -10.8, -10.7	Deep Binding Pocket
1971	VS1, VS2, VS3	-10.8	Deep Binding Pocket
853	VS1, VS3	-10.5, -10.8	Deep Binding Pocket
1976	VS2	-10.8	Allosterico
854	VS2	-10.8	Deep Binding Pocket
146	VS1, VS2	-10.7, -10.5	Deep Binding Pocket
1986	VS2, VS3	-10.4, -10.7	Allosterico , Altro

1989	VS2, VS3	-10.4, -10.7	Deep Binding Pocket, Altro
1237	VS3	-10.7	Deep Binding Pocket
1224	VS1, VS2, VS3	-10.5, -10.6, -10.6	Allosterico
1109	VS1, VS2, VS3	-10.6, -10.6, -10.5	Deep Binding Pocket
144	VS1, VS3	-10.6, -10.5	Deep Binding Pocket
151	VS1	-10.6	Deep Binding Pocket
1007	VS1, VS2, VS3	-10.5, -10.5, -10.6	Deep Binding Pocket
1991	VS2	-10.6	Deep Binding Pocket
205	VS2	-10.6	Deep Binding Pocket
592	VS2	-10.6	Deep Binding Pocket
273	VS2, VS3	-10.6, -10.4	Altro

309	VS1, VS2	-10.5	Altro
1574	VS1, VS2, VS3	-10.4, -10.5, -10.4	Altro
1970	VS1, VS3	-10.5, -10.2	Altro, Deep Binding Pocket
389	VS1	-10.5	Deep Binding Pocket
1009	VS1, VS2	-10.5	Deep Binding Pocket
1967	VS2	-10.5	Deep Binding Pocket
2002	VS2, VS3	-10.5	Deep Binding Pocket
1260	VS2, VS3	-10.5	Deep Binding Pocket
275	VS3	-10.5	Altro
850	VS1	-10.4	Altro
308	VS1, VS2, VS3	-10.4	Altro
851	VS1	-10.4	Altro
65	VS1, VS3	-10.4	Altro

143	VS1	-10.4	Deep Binding Pocket
1975	VS2	-10.4	Allosterico
420	VS2, VS3	-10.4, -10.2	Deep Binding Pocket
191	VS2, VS3	-10.4	Deep Binding Pocket
414	VS3	-10.4	Deep Binding Pocket
1993	VS3	-10.4	Altro
593	VS3	-10.4	Deep Binding Pocket
1987	VS3	-10.4	Deep Binding Pocket
89	VS1, VS2, VS3	-10.3	Allosterico
1982	VS1	-10.3	Altro
855	VS1	-10.3	Deep Binding Pocket
1968	VS1, VS2, VS3	-10.3, -10.3, -10.2	Deep Binding Pocket

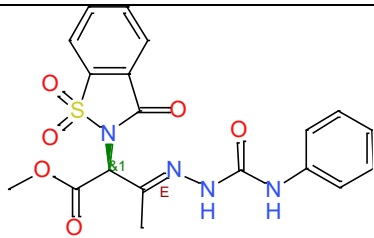
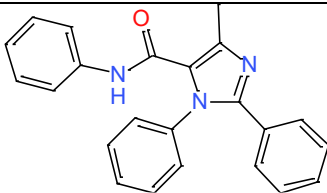
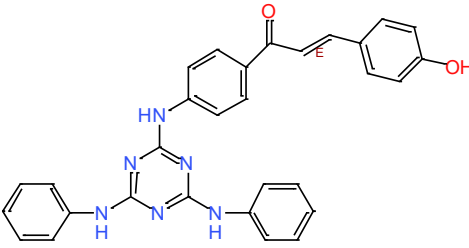
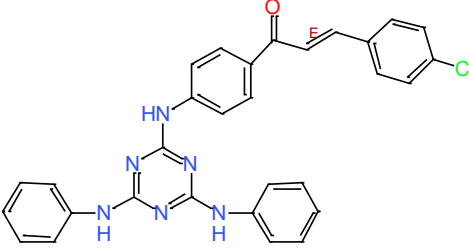
199	VS1	-10.3	Deep Binding Pocket
1777	VS1, VS2, VS3	-10.3	Deep Binding Pocket
1719	VS1	-10.3	Deep Binding Pocket
865	VS3	-10.3	Allosterico
170	VS3	-10.2	Deep Binding Pocket
302	VS3	-10.2	Altro
1944	VS3	-10.2	Deep Binding Pocket

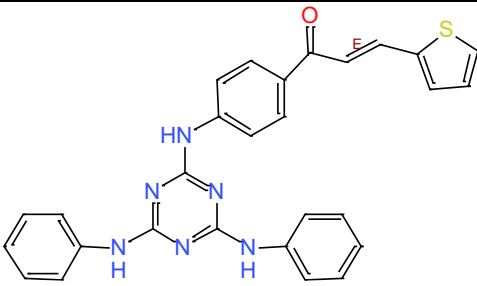
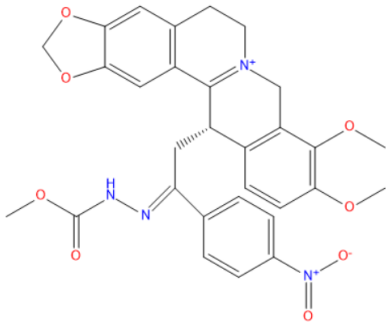
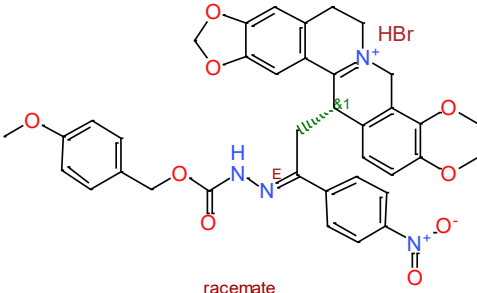
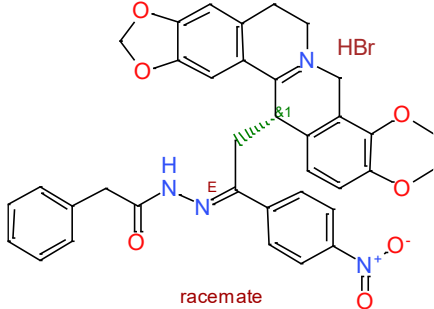
Tabella 1. *Tabella contenente i composti ottenuti dal processo di Virtual Screening ordinati dalla migliore (valore più basso) alla peggiore (valore più alto) energia di legame.*

Successivamente, sempre attraverso Raccoon, ho stilato una lista dei migliori 50 composti di ogni virtual screening (VS1, VS2, VS3) in termini di ΔG di binding, ho valutato le loro pose e ho ulteriormente preso i migliori 10 tra tutti i VS che andassero a posizionarsi all'interno del sito allosterico. Da questi composti, i più

rilevanti sono stati questi 9 composti: 89, 865, 1222, 1223, 1224, 1972, 1975, 1976, 1994.

Attraverso il software ChemDraw ho controllato la struttura in 2D di questi composti e la loro chiralità:

<i>NOME</i>	<i>nHTVS</i>	<i>ENERGIA</i>	<i>COMPOSTO</i>
89	VS1, VS2, VS3	-10.3	 racemate
865	VS3	-10.3	
1222	VS1	-11.1	
1223	VS3	-11.1	

1224	VS1, VS2, VS3	-10.5, -10.6, - 10.6	
1972	VS2	-11.1	
1975	VS2	-10.4	 racemate
1976	VS2	-10.8	 racemate

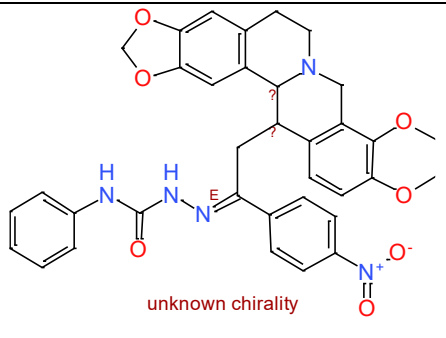
1994	VS1, VS2	-10.3, -10.6	 Chemical structure of Compound 89, a complex molecule featuring a benzodioxane system, a piperidine ring, a benzene ring with methoxy groups, and a phenyl ring with a nitro group. The structure is labeled with 'unknown chirality' in red text.
------	----------	--------------	---

Tabella 2. *Migliori 9 composti che agiscono nel sito allosterico con le loro relative strutture 2D*

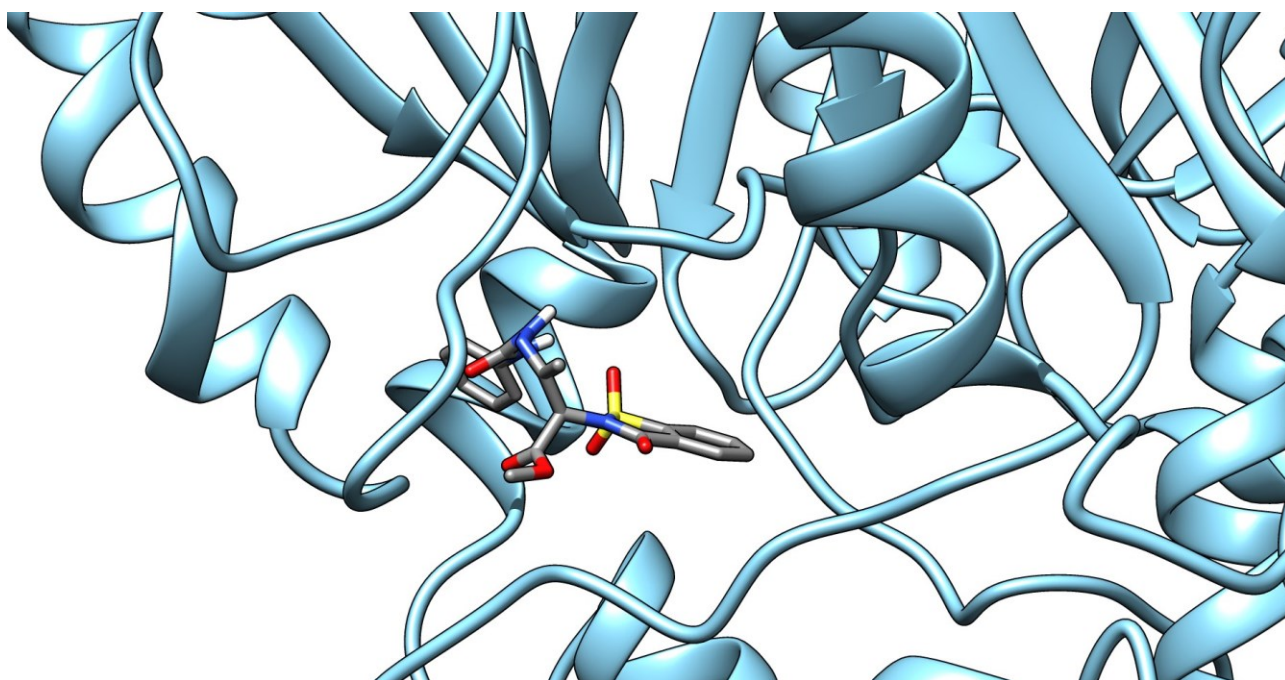


Fig. 6.1 *Posa predetta del docking per il Composto 89*

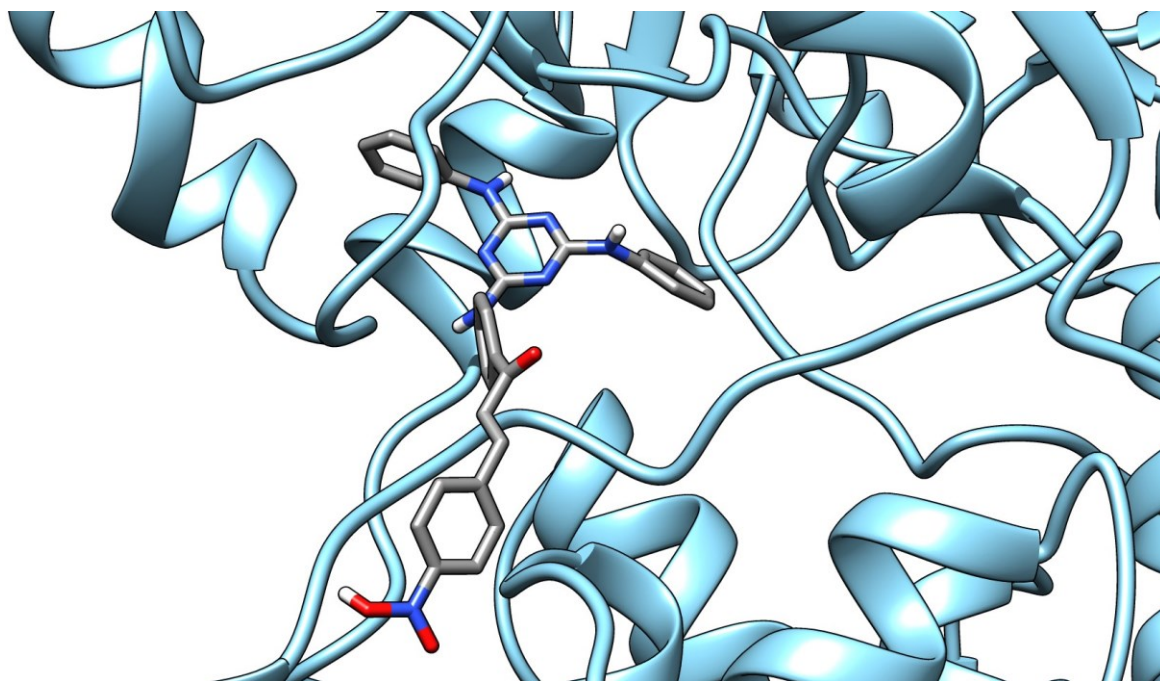


Fig. 6.2 *Posa predetta del docking per il Composto 1222*

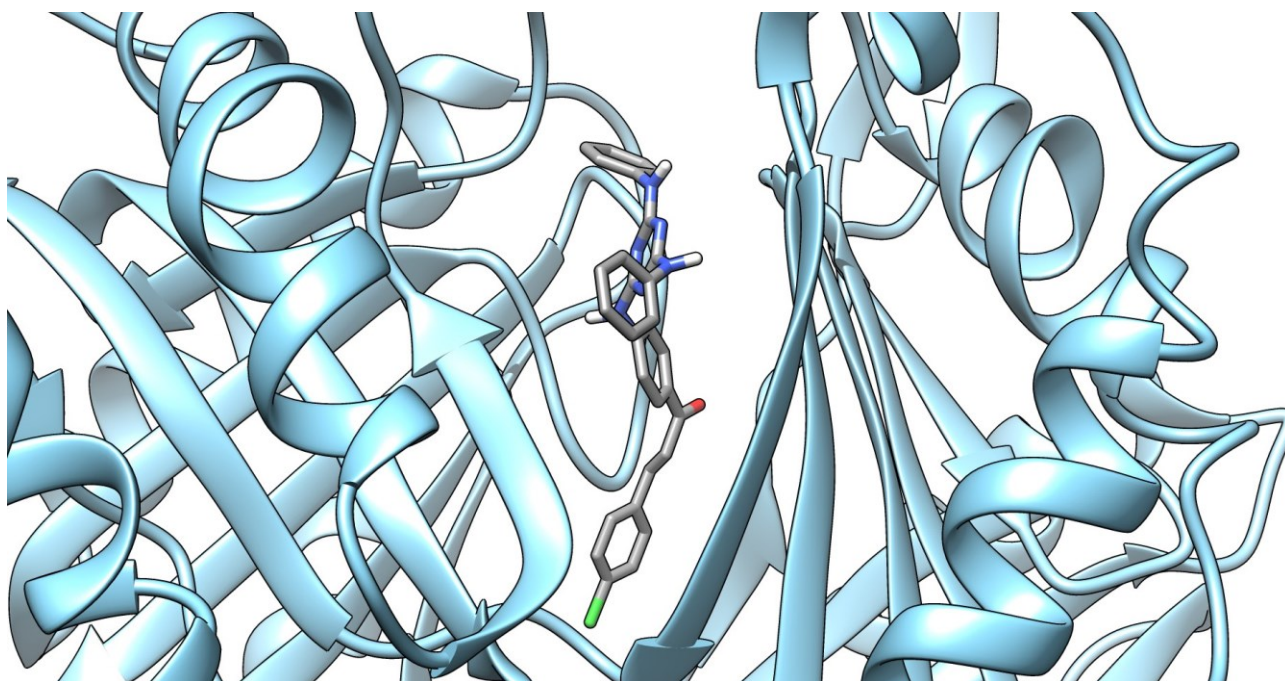


Fig. 6.3 *Posa predetta del docking per il Composto 1223*

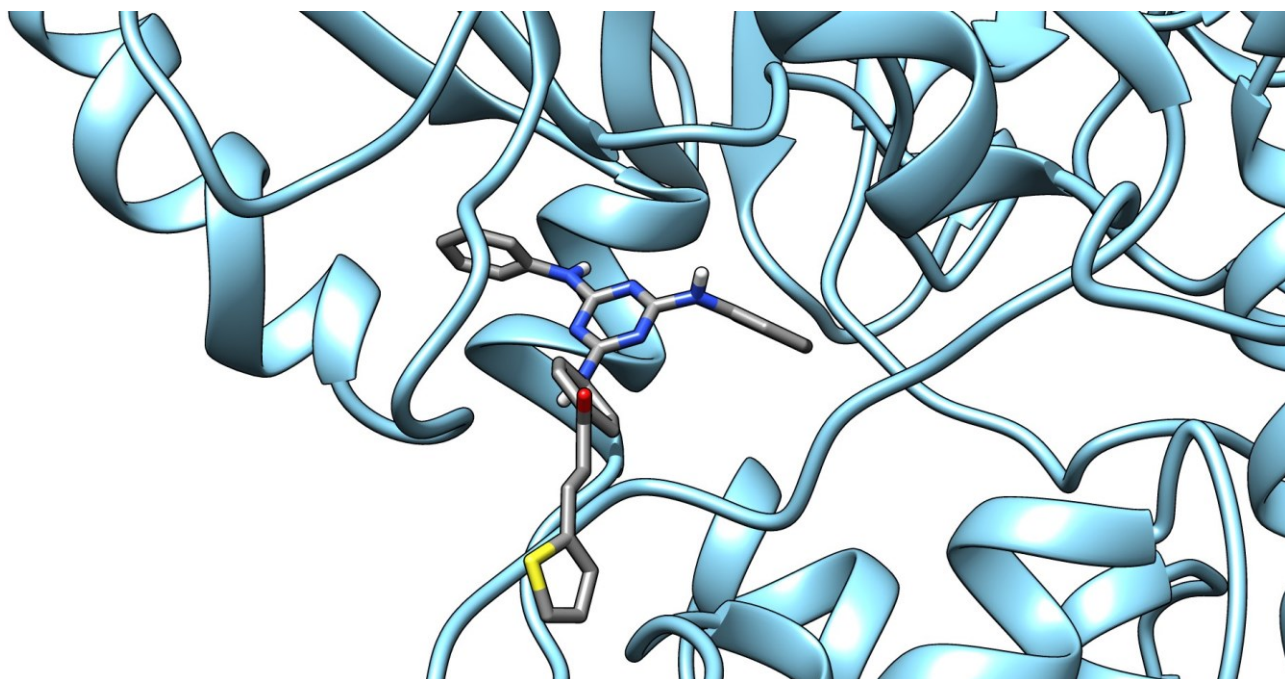


Fig. 6.4 *Posa predetta del docking per il Composto 1224*

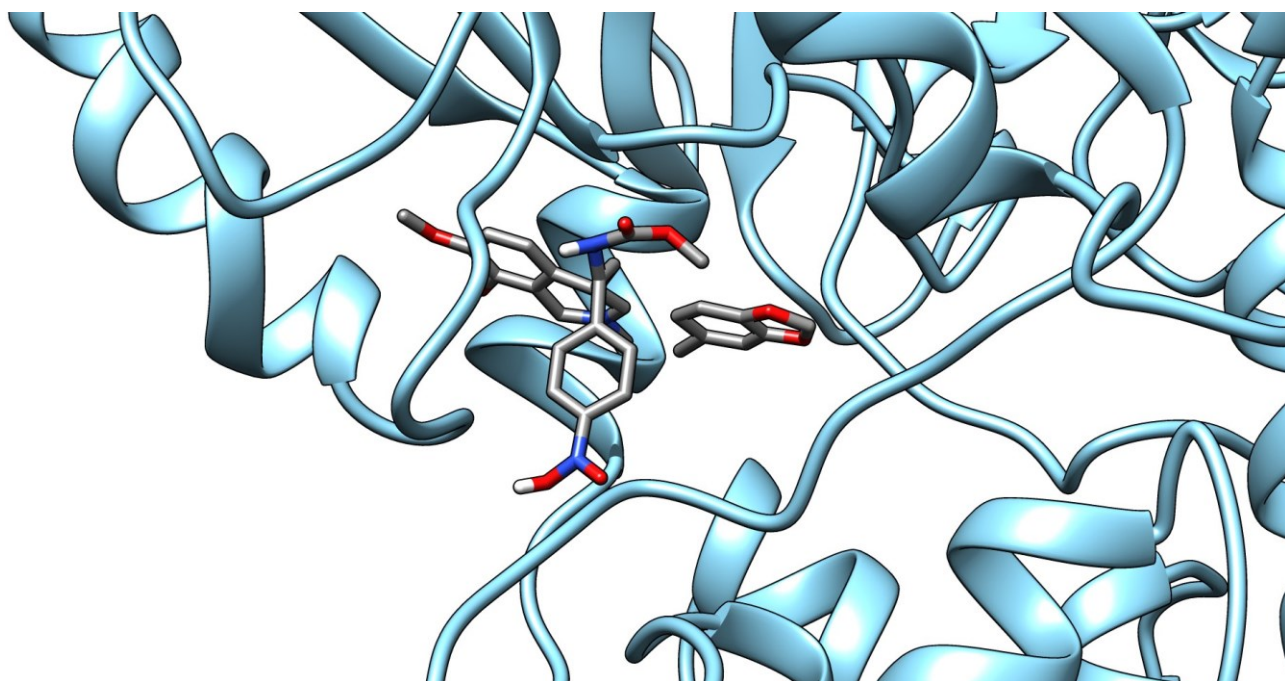


Fig. 6.5 *Posa predetta del docking per il Composto 1972*

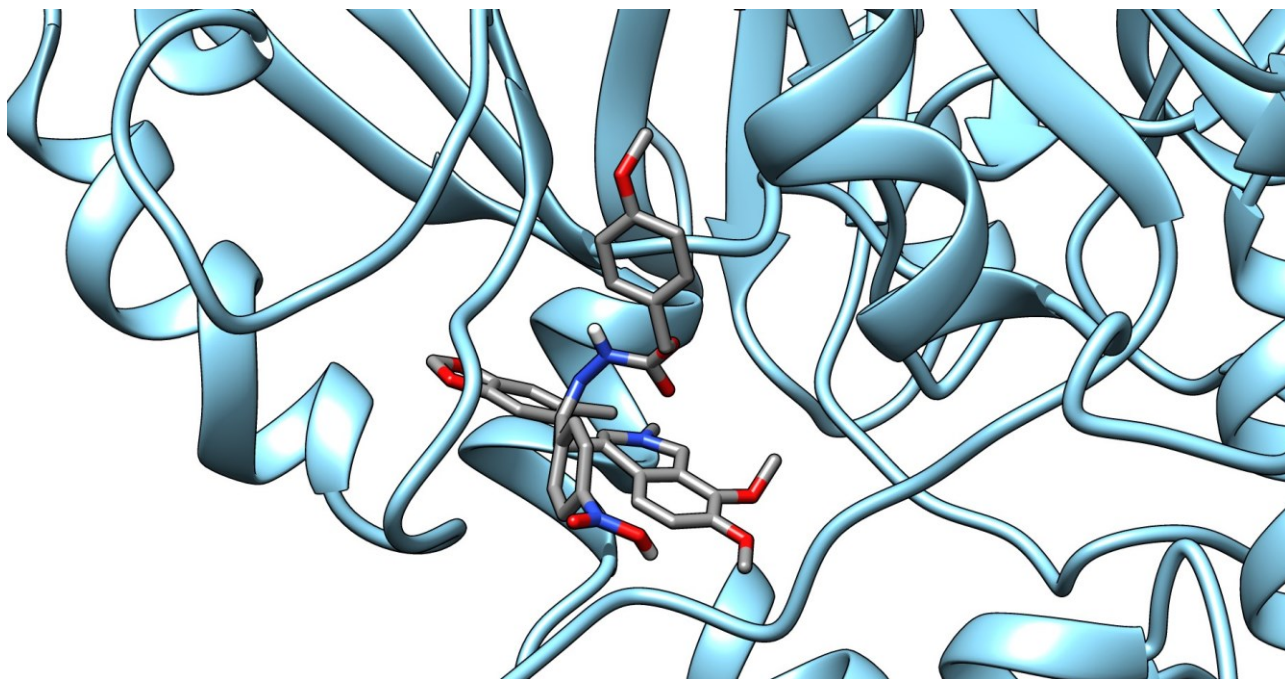


Fig.6.6 *Posa predetta del docking per il Composto 1975*

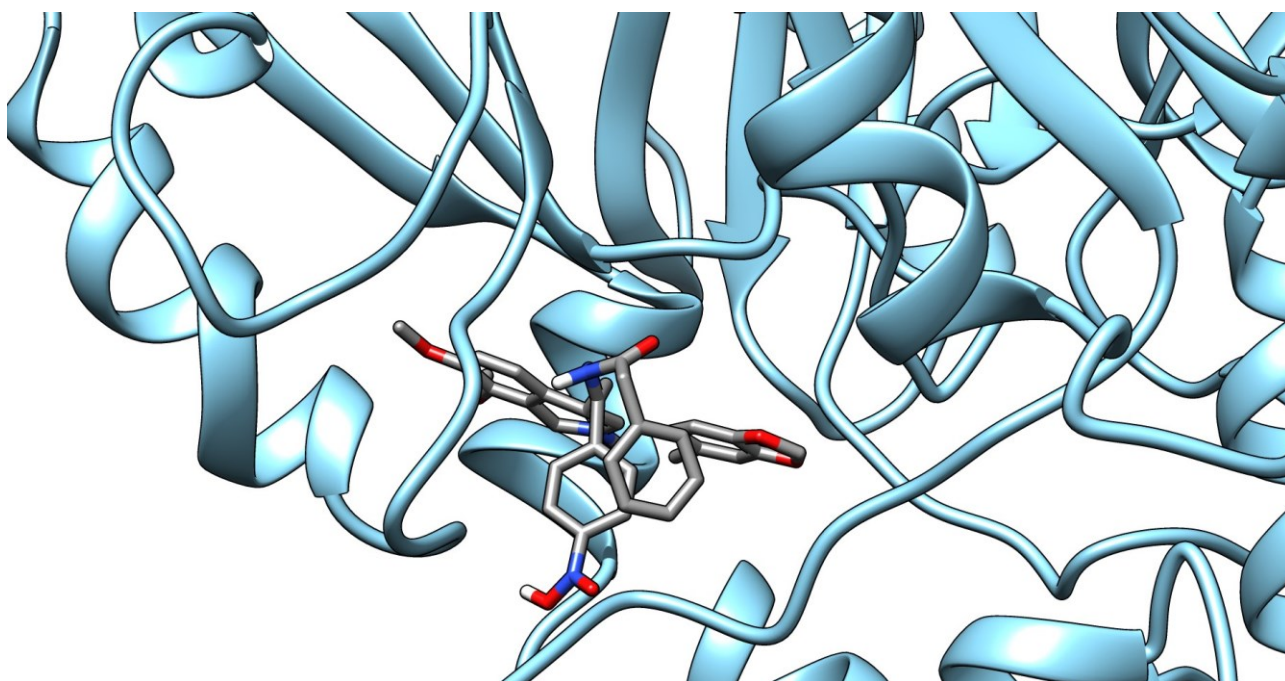


Fig. 6.7 *Posa predetta del docking per il Composto 1976*

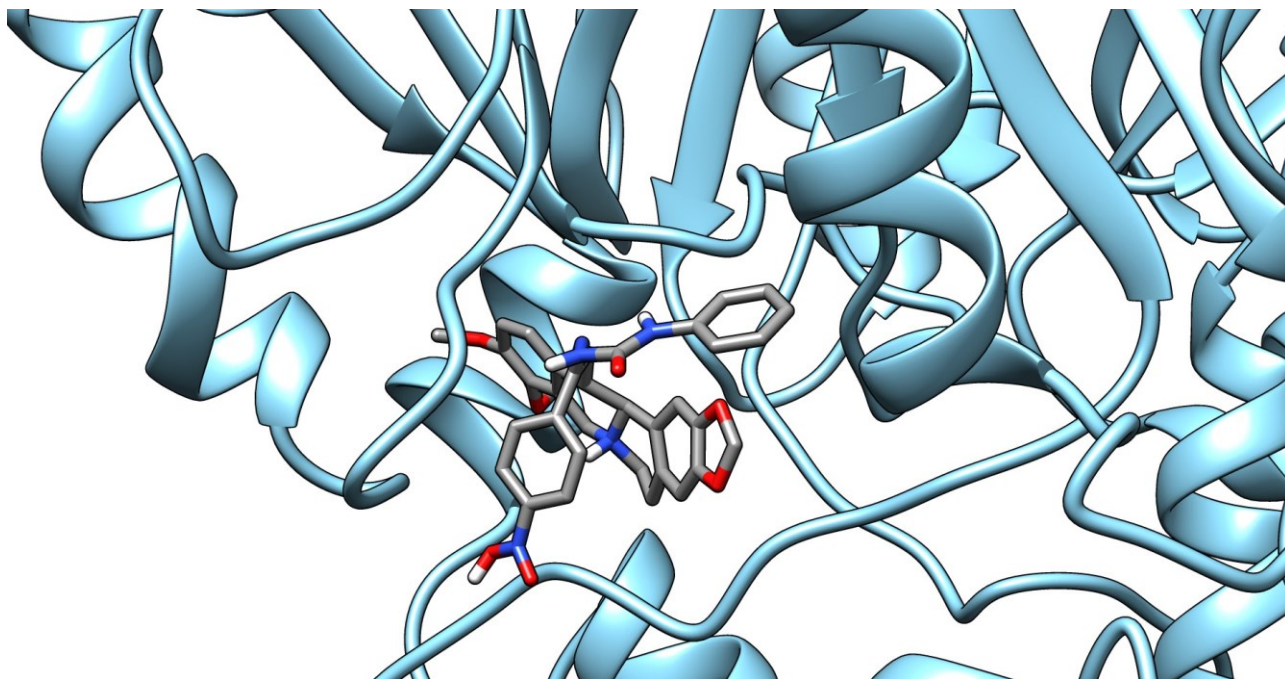
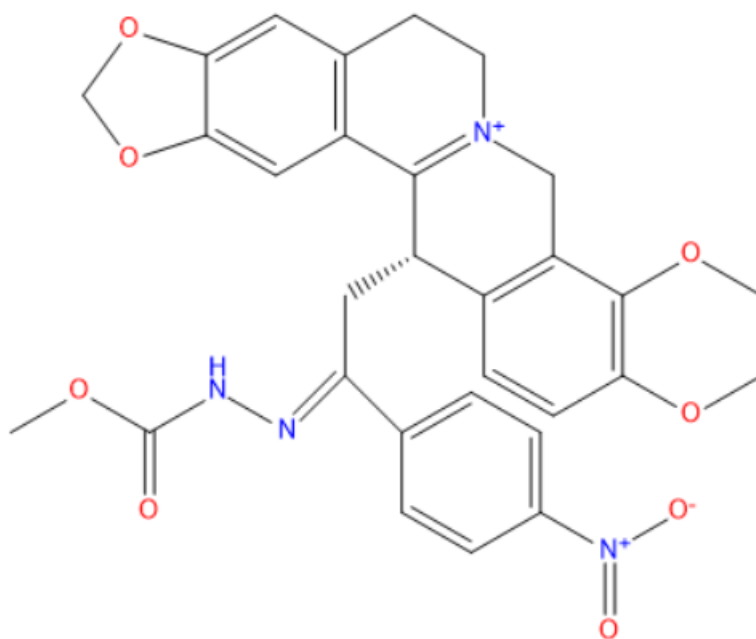


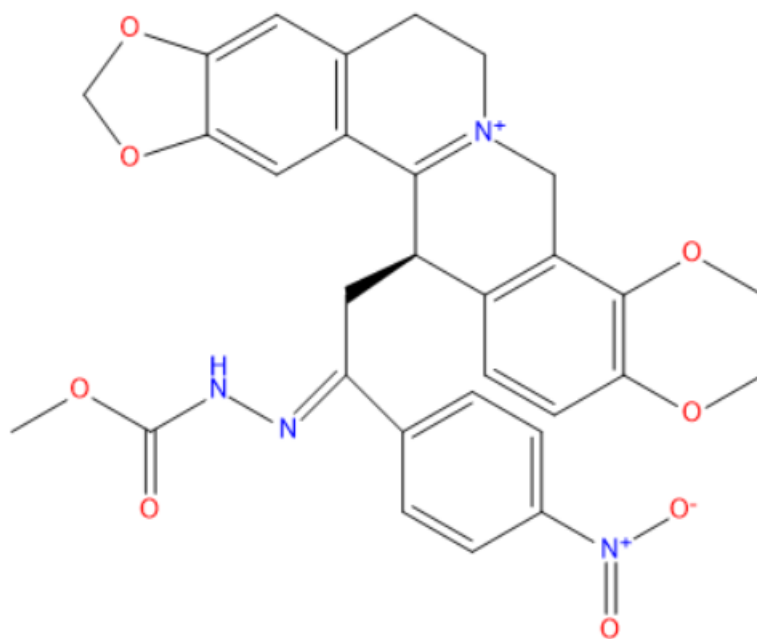
Fig. 6.8 *Posa predetta del docking per il **Composto 1994***

La scelta per analisi più approfondite è ricaduta sui composti 1972 e 1994 per la loro analogia strutturale con la DHBER (diidroberberina) e la THBER (tetraidroberberina). All'interno del database questi composti, però, si presentavano in forma racemica, di conseguenza ho ritenuto opportuno proseguire le analisi disponendo di entrambi gli enantiomeri R ed S di questi composti. Servendomi del software ChemDraw ho disegnato gli enantiomeri di questi composti:

1972 S



1972 R



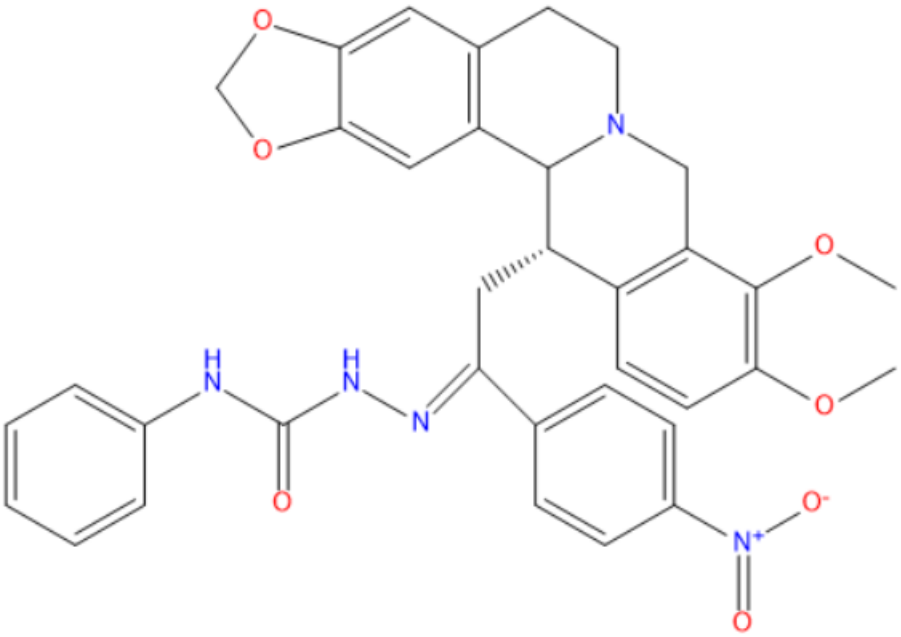
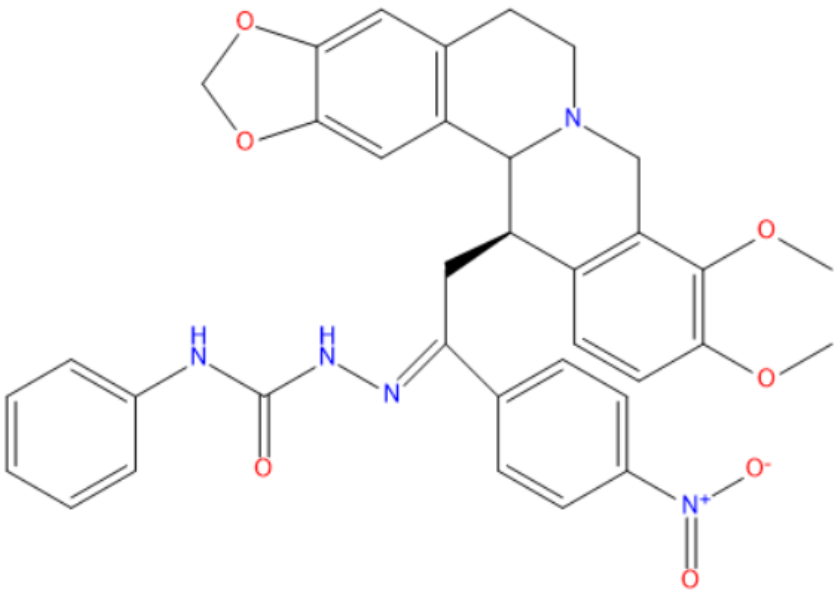
1994 S	
1994 R	

Tabella 3. *Enantiomeri S ed R dei composti 1972 e 1994 realizzati attraverso ChemDraw.*

Per quanto riguarda le prove microbiologiche effettuate con questi composti, esse sono state condotte sulla miscela racemica dei composti selezionati, di conseguenza i valori di MIC riportati corrisponderanno, per convenzione, ad un valore mediato ipotetico ottenuto con i due enantiomeri.

5.2 (OFF-TOPIC) Prospettive future: LasR e Quorum Sensing

Il *quorum sensing*, nei batteri consente di regolare globalmente l'espressione genica in base alla densità di popolazione^{91,92}. In *Pseudomonas Aeruginosa* questo meccanismo è coinvolto nella fibrosi cistica. Allo scopo di sviluppare metodi di inibizione di *quorum sensing* gli studiosi si sono concentrati sulla proteina LasR, che funge da attivatore trascrizionale di questo processo in *Pseudomonas Aeruginosa*⁹³. In un recente studio sono stati effettuati virtual screening e docking nei confronti del *ligand binding domain* (LBD) di LasR; nello specifico è stato ipotizzato un modello farmacoforico attraverso lo screening di 2373 composti approvati dalla Food and Drug Administration: di questi composti 6 sono risultati ottimi candidati per essere inibitori di LasR-LBD a causa delle loro evidenti analogie con inibitori già conosciuti⁹⁴.

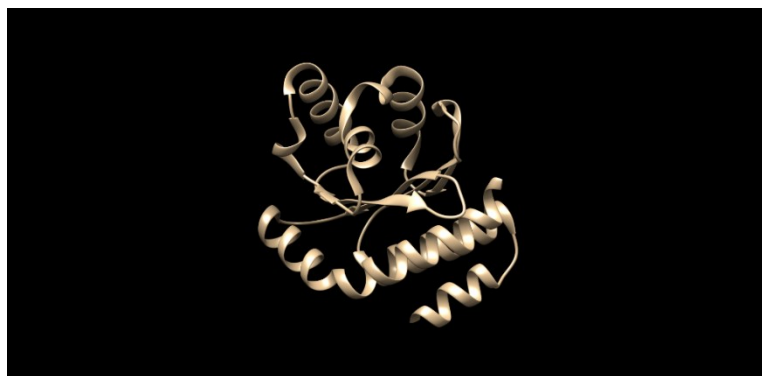
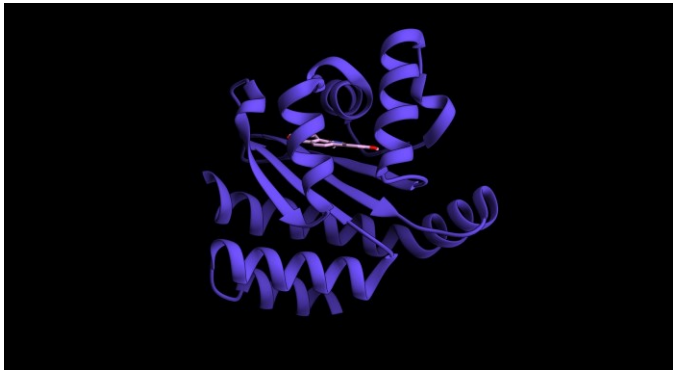
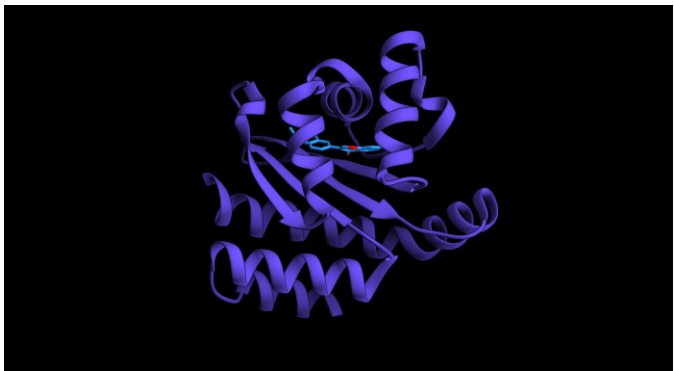
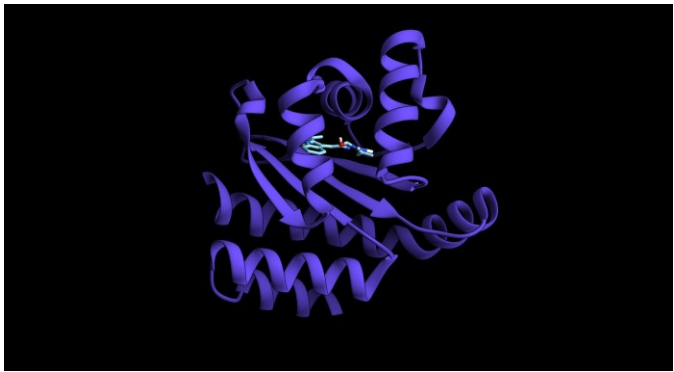
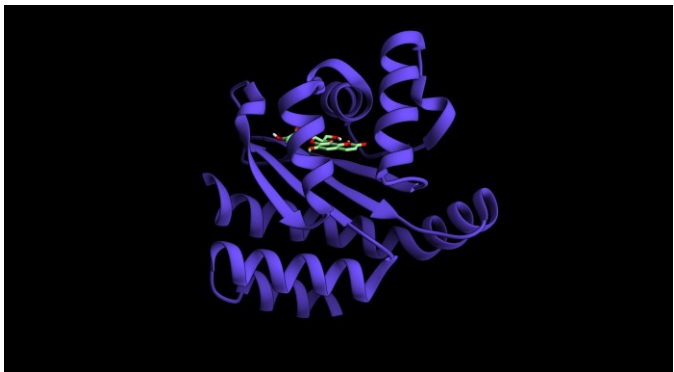


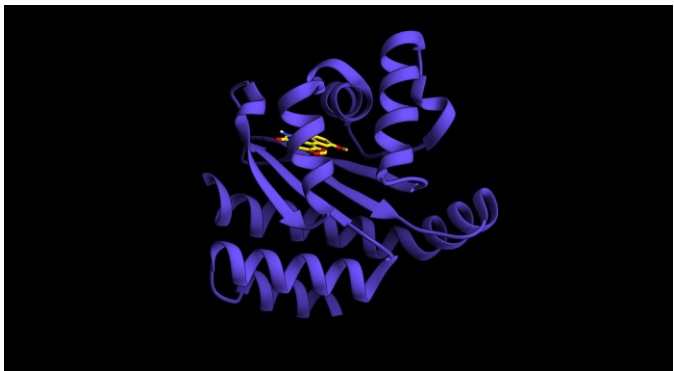
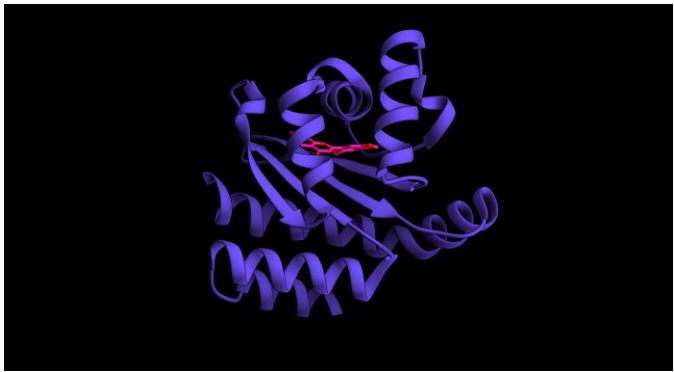
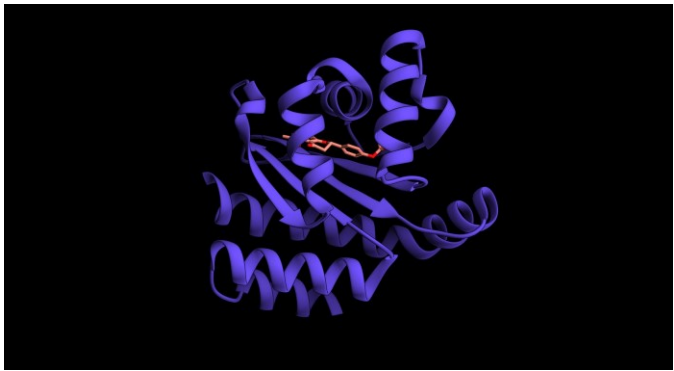
Fig. 7 *Struttura di LasR-LBD*
derivante dal file PDB 2uv0

Sulla base di ciò, per acquisire dimestichezza con i software di virtual screening ho effettuato uno screening molto simile a questo utilizzando il catalogo dei *Natural Products* del database *ZINC20*. *ZINC* è una piattaforma contenente più di 1 miliardo e 400 milioni di composti divisi in 310 cataloghi che sono disponibili commercialmente per tutti⁹⁵. Il procedimento effettuato è identico a quello che ho condotto con il database dei composti analoghi alla Berberina: effettuato il Virtual screening in triplicato prendendo prima una top 50 di composti e successivamente una top 10, l'unica differenza sta nel fatto che, essendo un'esercitazione, mi sono fermato alla top 10 di ogni virtual screening. Di seguito sono presenti i risultati:

VIRTUAL SCREENING 1

CODICE	nHTVS	ENERGIA	IMMAGINE
57	VS1	-12.3	

95	VS1	-11.9	
52	VS1	-11.4	
69	VS1	-11.4	

89	VS1	-11.4	
88	VS1	-11.3	
74	VS1	-11.2	

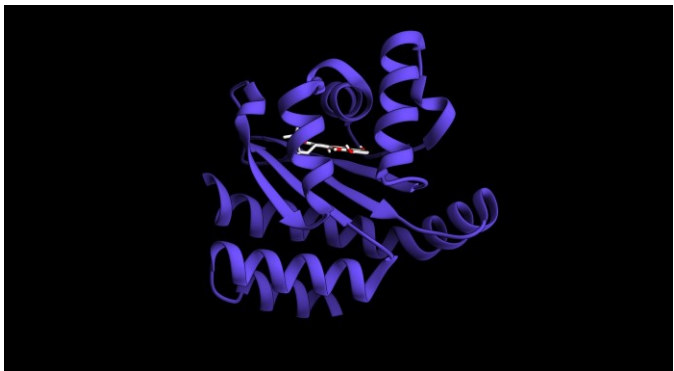
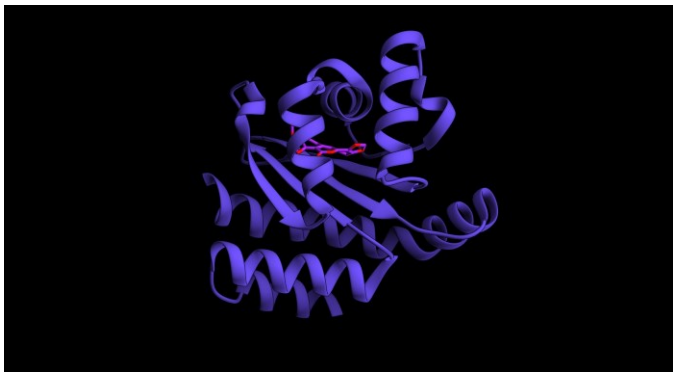
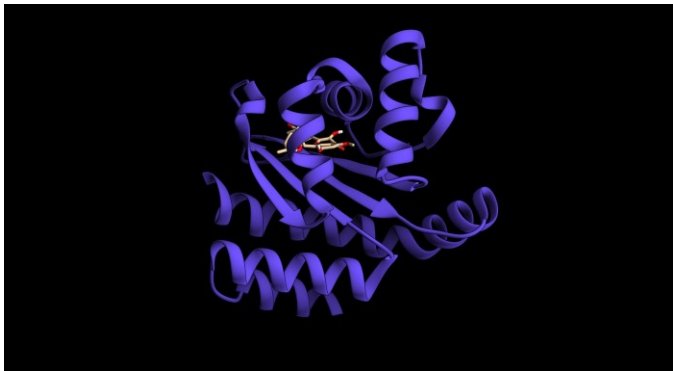
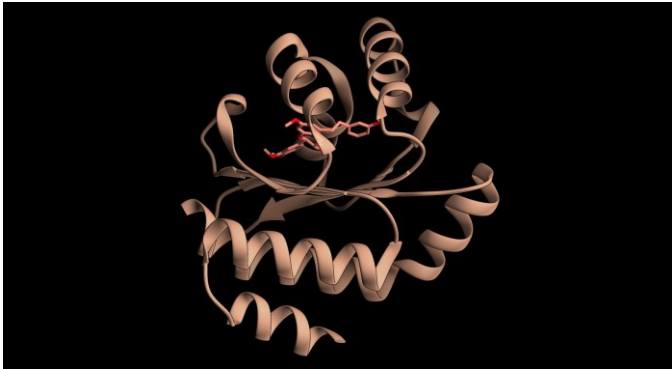
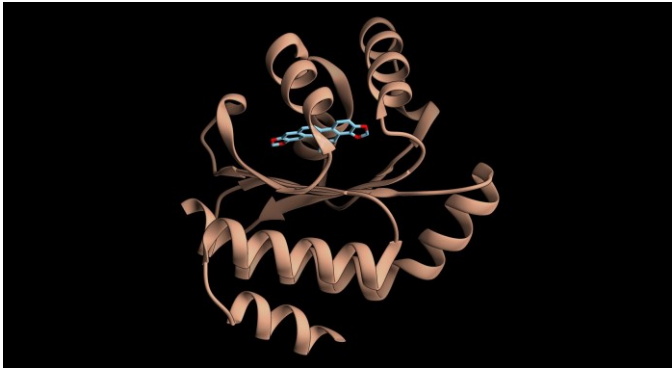
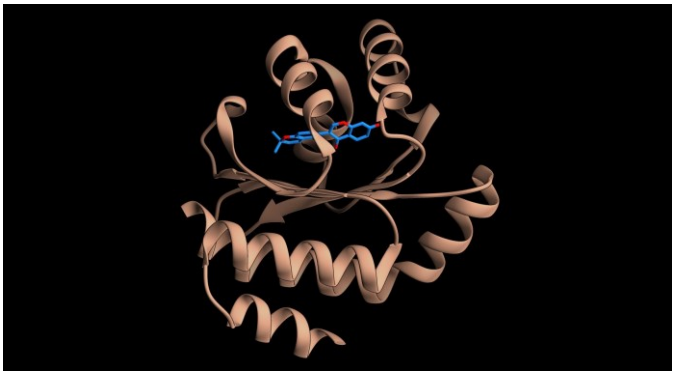
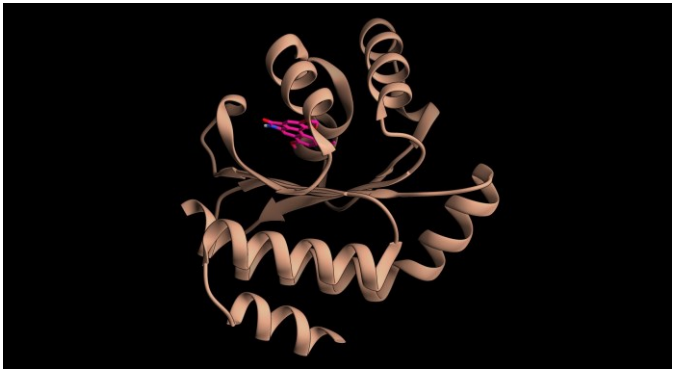
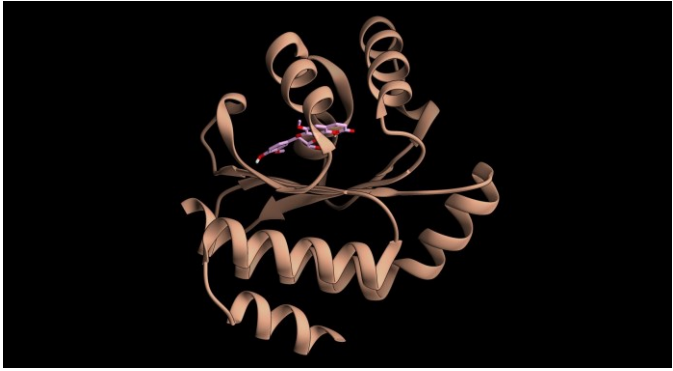
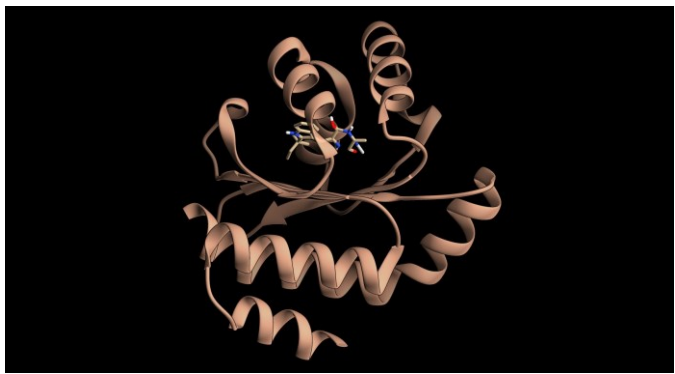
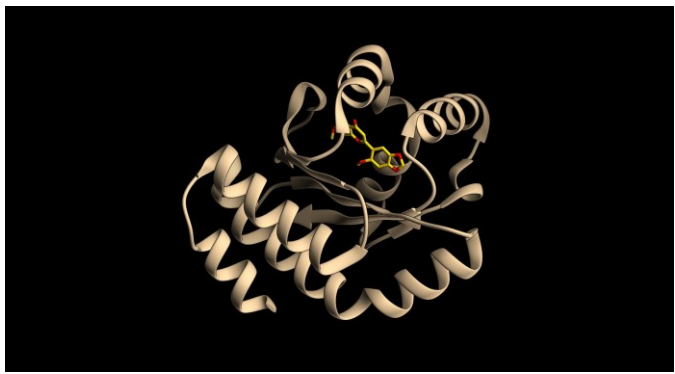
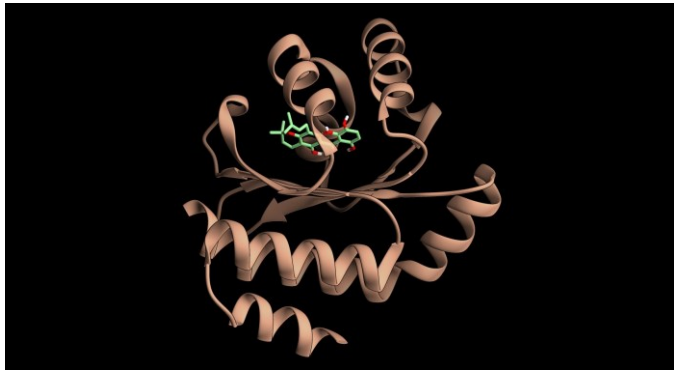
84	VS1	-11.2	
137	VS1	-11.2	
32	VS1	-11.1	

Tabella 4. *Composti del Virtual Screening 1 di LasR disposti in ordine crescente di energia.*

VIRTUAL SCREENING 2

CODICE	nHTVS	ENERGIA	IMMAGINE
87	VS2	-12.6	
57	VS2	-12.3	
91	VS2	-12.1	

95	VS2	-11.9	
89	VS2	-11.4	
69	VS2	-11.4	

52	VS2	-11.4	
88	VS2	-11.3	
84	VS2	-11.2	

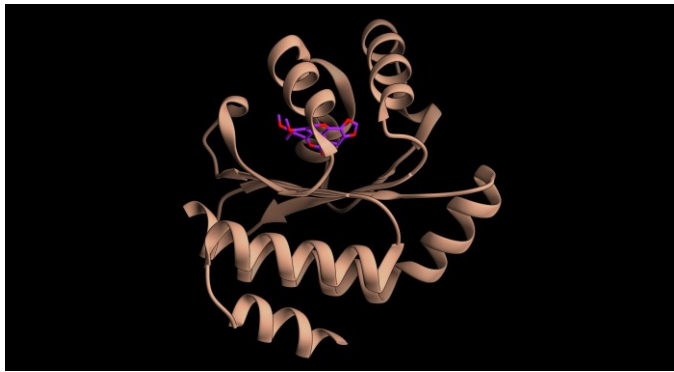
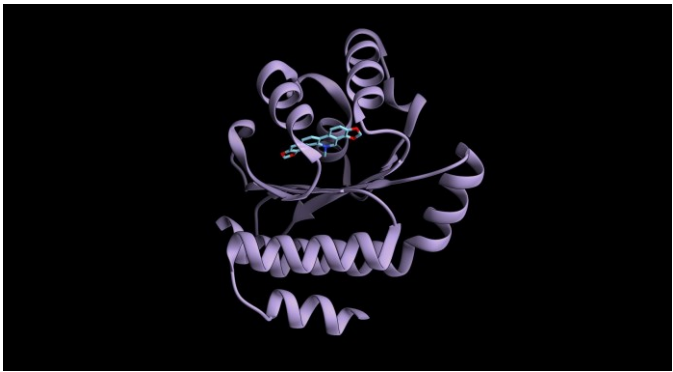
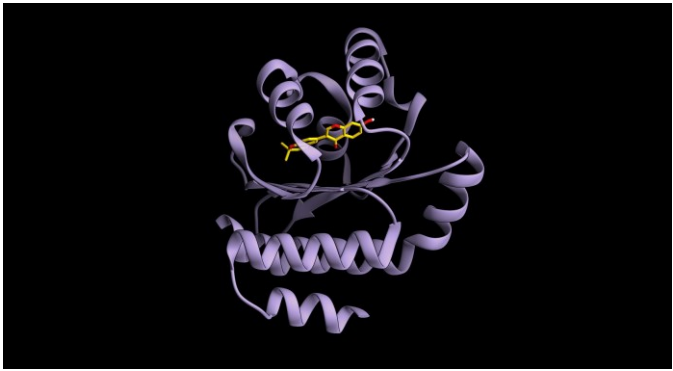
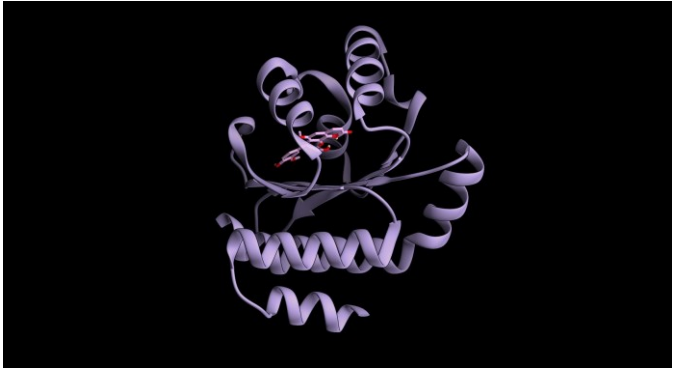
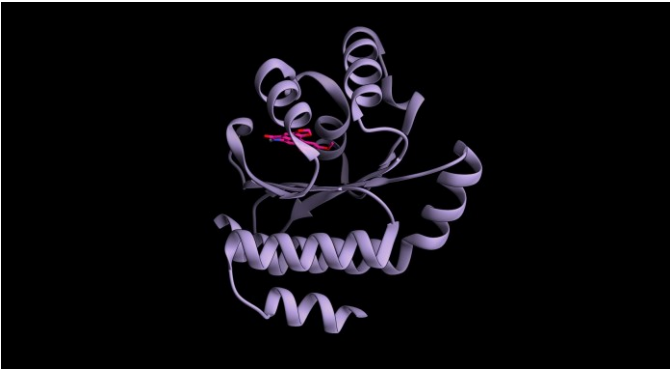
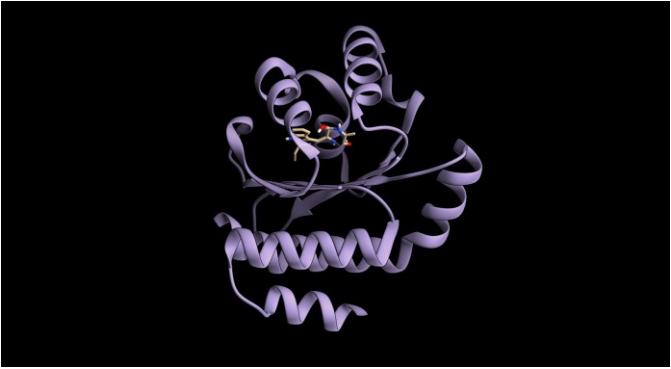
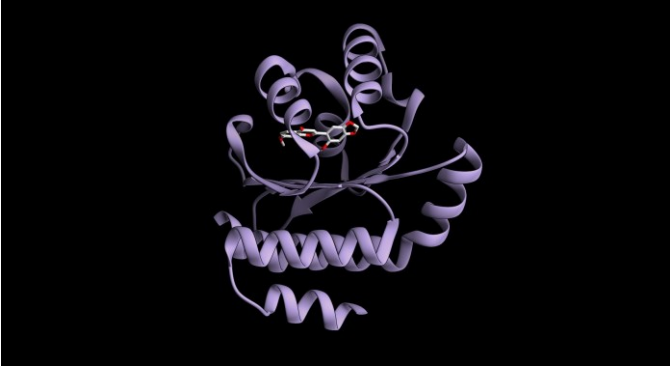
137	VS2	-11.2	
------------	-----	-------	--

Tabella 5. *Composti del Virtual Screening 2 di LasR disposti in ordine crescente di energia.*

VIRTUAL SCREENING 3

CODICE	nHTVS	ENERGIA	IMMAGINE
87	VS3	-12.6	

57	VS3	-12.3	
95	VS3	-11.9	
69	VS3	-11.5	

89	VS3	-11.4	
52	VS3	-11.4	
88	VS3	-11.2	

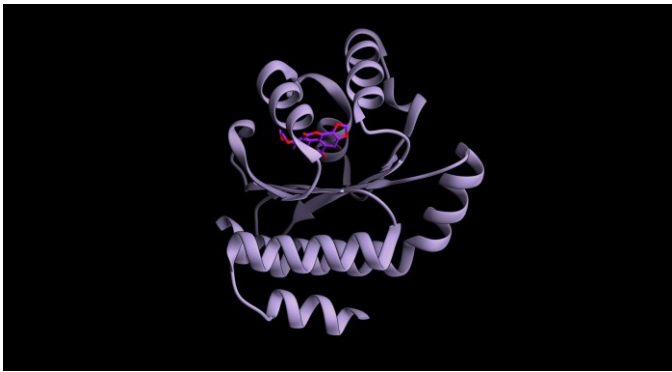
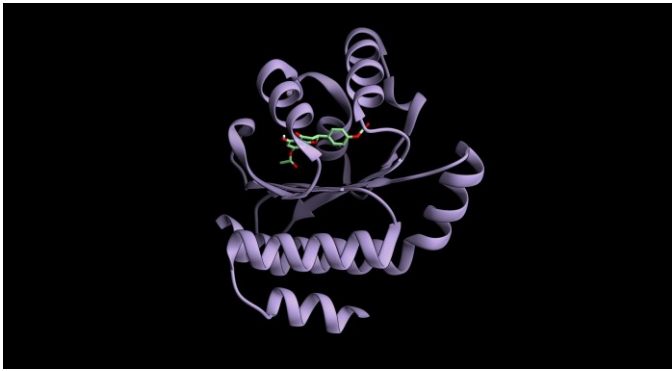
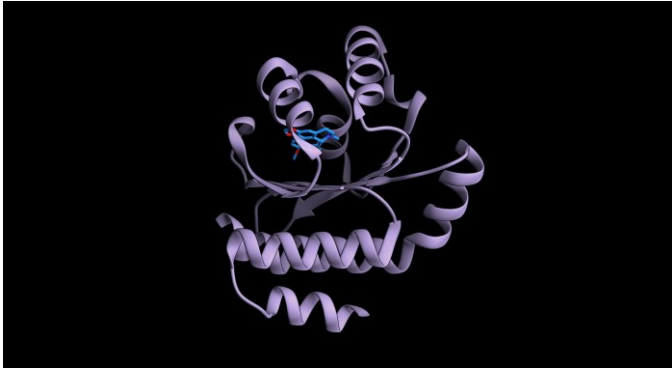
137	VS3	-11.2	
74	VS3	-11.2	
131	VS3	-11.1	

Tabella 6. *Composti del Virtual Screening 3 di LasR disposti in ordine crescente di energia.*

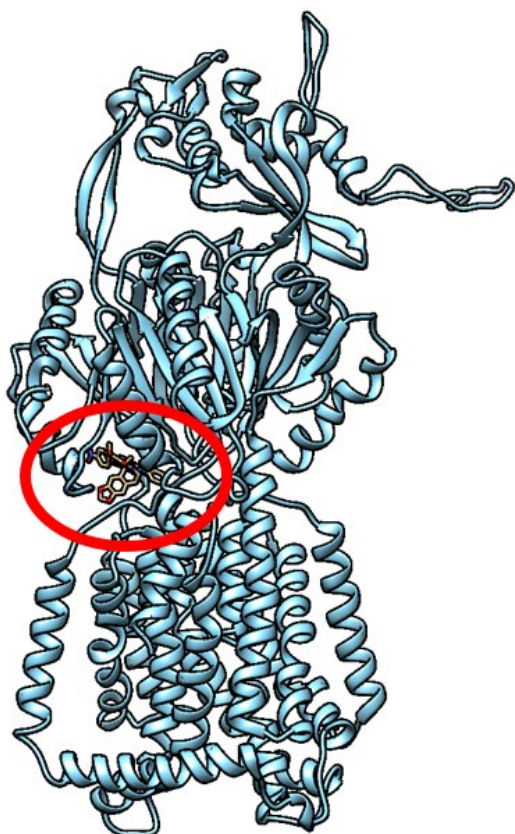
Da quello che ho potuto evincere, tutti questi composti hanno un'elevatissima affinità con LBD, con energie di binding tutte oltre i -11 Kcal/mol con anche alcuni composti che hanno raggiunto i -12,6 Kcal/mol. Queste interazioni potrebbero risultare ancor più efficienti attraverso processi di docking e dinamica molecolare identificando questi composti come promettenti candidati inibitori del processo di quorum sensing in *Pseudomonas eruginosa*.

Capitolo sesto

DOCKING DEI COMPOSTI SCELTI CON PA7 E CEPPI CLINICI

6.0.1 Parametri utilizzati per il docking

Tutti i docking sono stati effettuati utilizzando una GRID box di 126x126x126 Å³ per il blind, mentre per il focused la GRID box è stata settata ai valori di 50x50x50 Å³ e centrata sul ligando. L'algoritmo utilizzato è stato quello Genetico (GA) e le run effettuate sono state sempre 100. Il file di output è di tipo Lamarckiano. In quasi tutti i seguenti docking il sito d'interazione è il sito allosterico o di *cleft* (**Fig.**



8 *Esempio di ligando all'interno del sito allosterico*). Per ogni docking verranno mostrati la posizione ravvicinata del ligando all'interno del recettore, le energie di binding, intermolecolare, interna, torsionale e di non legame. In più, nell'ultima immagine verranno mostrati gli aminoacidi presenti all'interno di siti di interazione e i legami a idrogeno, se presenti. La valutazione e la scelta delle pose di binding per le analisi successive è

stata impostata nella seguente maniera: numero di interazioni con amminoacidi

presenti nella tasca di binding, numero di amminoacidi vicini a quelli presenti nella tasca di binding, ΔG di legame, analogia con il comportamento dello stesso ligando in PA7 (controllo positivo) ed infine prove microbiologiche in vitro.

Allosteric pocket (ALP)

F560, L561, P562,
E563, E564, S611,
P665, P664, L666,
S673, G674, F675,
E822, Q824, Q856,
S831, Q824, A825,
A834, S830, E833

Fig. 9 Di seguito sono riportati gli amminoacidi facenti parte del sito allosterico

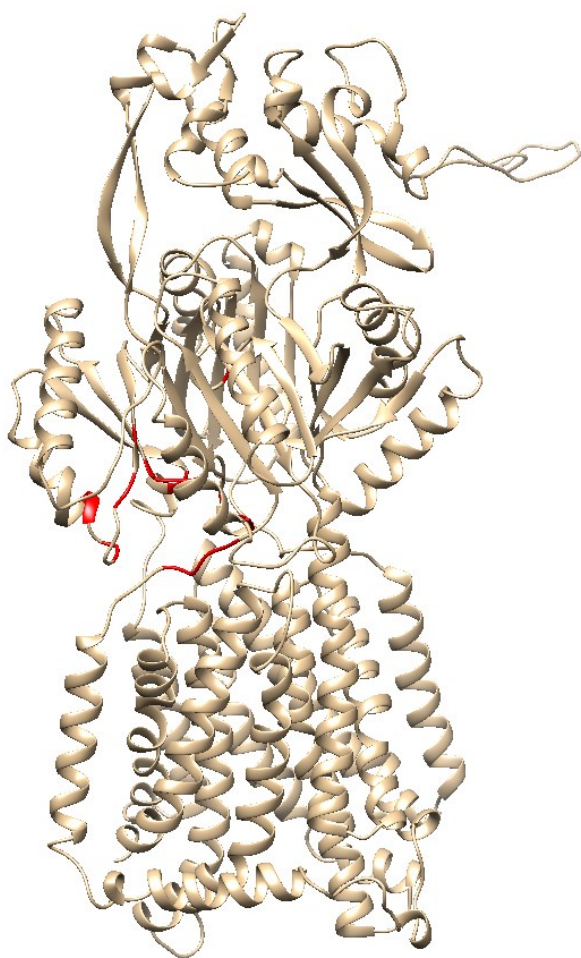
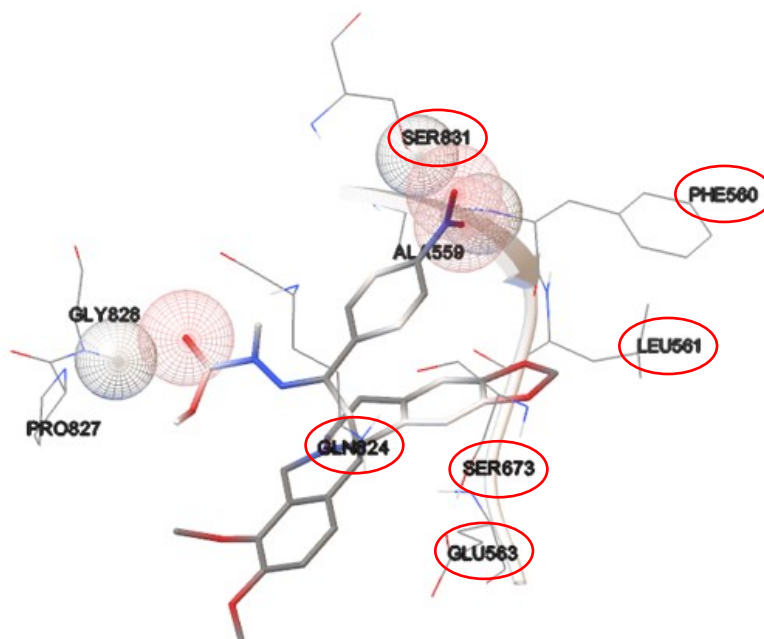
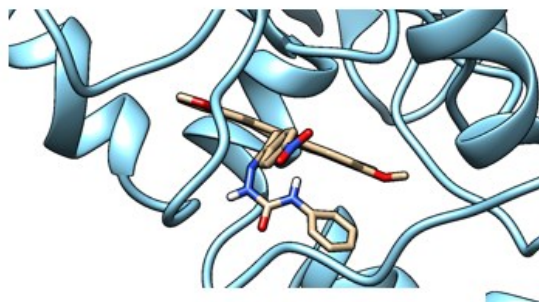


Fig. 10 In rosso sono rappresentati gli amminoacidi facenti parte del sito allosterico.

6.1.1 Docking di 1972 R con PA7

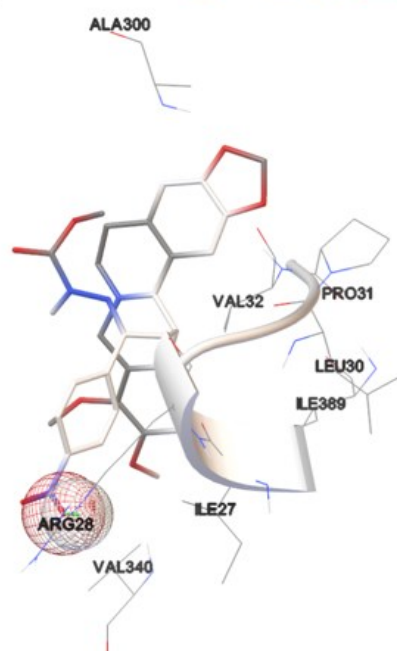
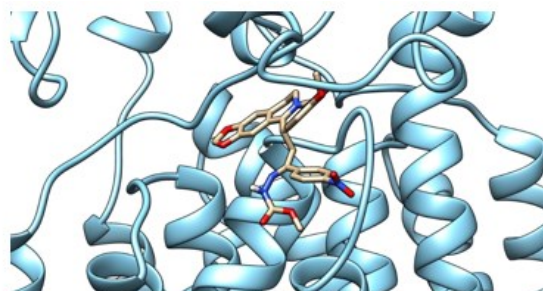
Binding Energy: -10.4 Kcal/mol
kI : 23.61uM
Intermolecular Energy : -12.79 Kcal/mol
Internal Energy : -2.69 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.69 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS:



Il primo composto testato è stato l'enantiomero R di 1972, il docking è stato effettuato con PA7 come recettore, essendo state già verificate le ottime interazioni, ci si poteva già aspettare interazione con vari amminoacidi della tasca di legame come SER831, GLN824, SER673, GLU563, LEU561, PHE560. In totale sono presenti anche 3 legami a idrogeno.

6.1.2 Docking di 1972 R con AR48

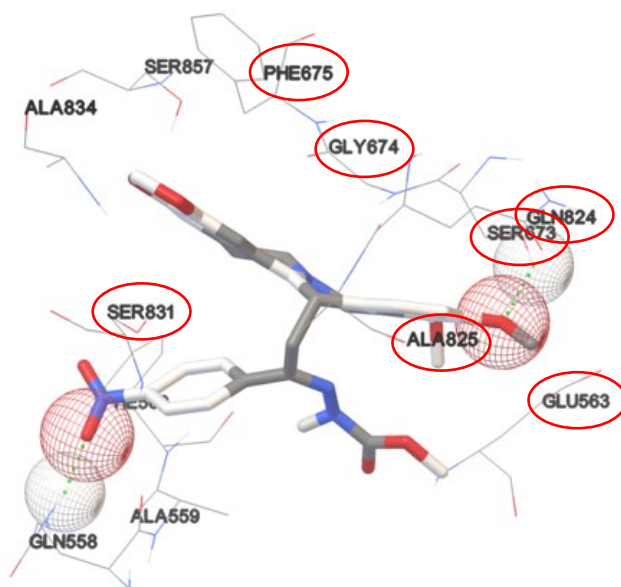
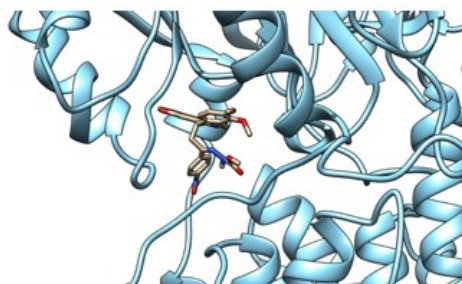
Binding Energy:	-9.49 Kcal/mol
K _I :	110,83uM
Intermolecular Energy :	-11.88 Kcal/mol
Internal Energy :	-2.32 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-2.32 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	108,48



Il primo ceppo clinico analizzato è l'AR48. In questo caso non è stata trovata nessuna posa all'interno del sito allosterico facendo pensare ad una incompatibilità del ligando con questo ceppo. È presente un legame a idrogeno.

6.1.3 Docking di 1972 R con AR86

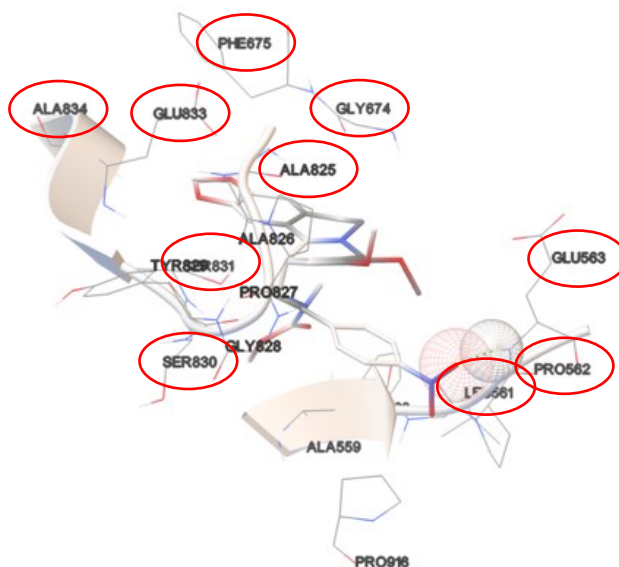
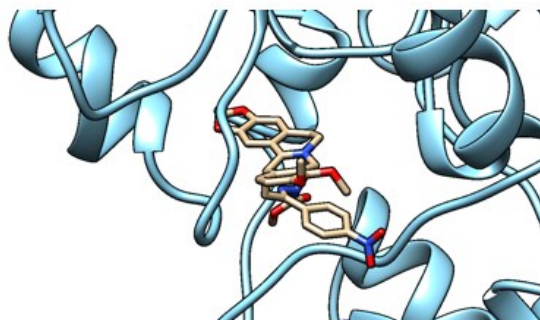
Binding Energy: -8.38 Kcal/mol
kI : 721.46uM
Intermolecular Energy : -10.77 Kcal/mol
Internal Energy : -2.73 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.73 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 105.4



Il risultato è diverso con il ceppo clinico AR86 che mostra una discreta energia di binding nel sito allosterico e numerose interazioni: SER831, GLY674, PHE675, ALA825, SER673, GLN824, GLU563. Ci sono in totale due legami a idrogeno.

6.1.4 Docking di 1972 R con C15

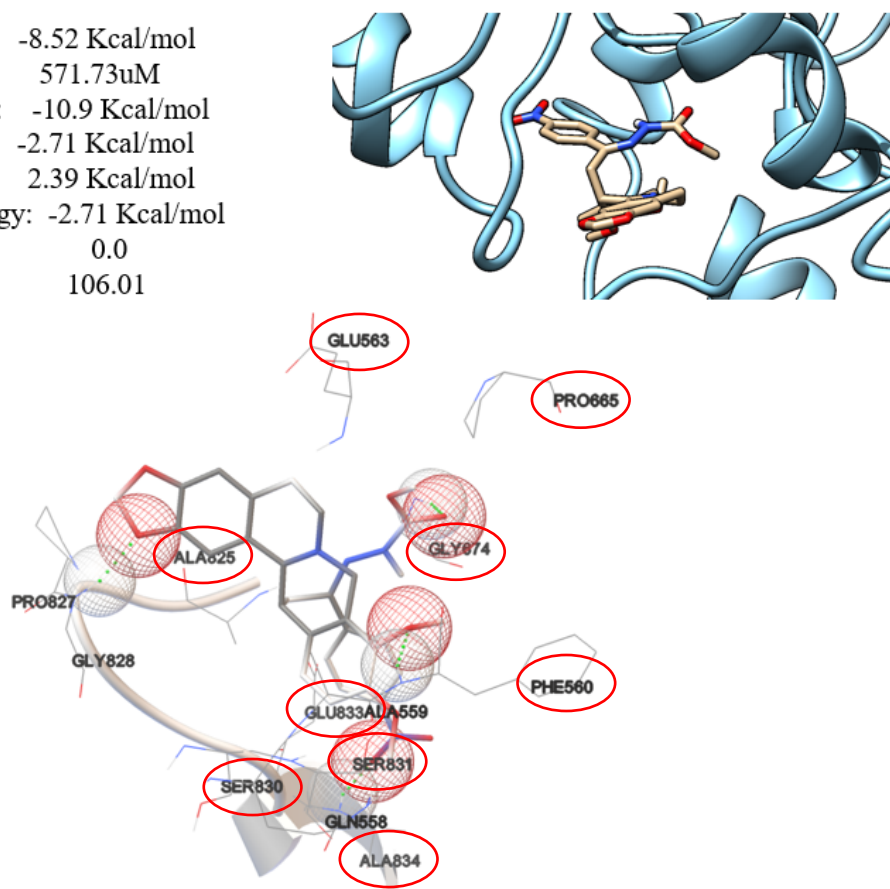
Binding Energy:	-7.93 Kcal/mol
kI :	1.55uM
Intermolecular Energy :	-10.31 Kcal/mol
Internal Energy :	-3.0 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-3,0 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	105.65



Il ceppo clinico C15 è caratterizzato da numerose interazioni, l'energia di binding è più alta (meno negativa) dei composti di riferimento e denota una bassa attività dello stesso nei confronti di tale recettore. Interazioni: ALA834, GLU833, PHE675, GLY674, ALA825, SER831, SER830, LEU561, PRO562, GLU563. In totale è presente un solo legame a idrogeno.

6.1.5 Docking di 1972 R con NC04

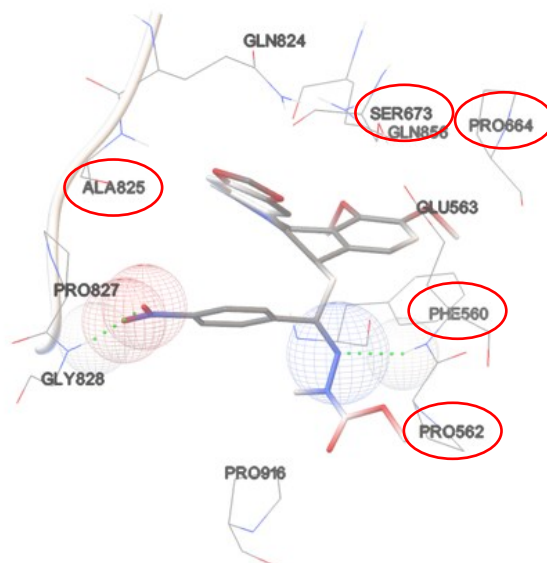
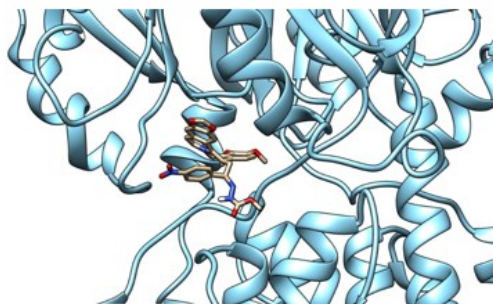
Binding Energy:	-8.52 Kcal/mol
K _I :	571.73uM
Intermolecular Energy :	-10.9 Kcal/mol
Internal Energy :	-2.71 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-2.71 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	106.01



Il ceppo clinico NC04 ha presentato la più elevata affinità (energia di binding più negativa), le interazioni sono diffuse intorno a tutta la tasca di legame, probabilmente questo ha contribuito ad abbassare l'energia di binding, inoltre le interazioni con amminoacidi non facenti parte della tasca di binding sono in realtà molto vicine a quelle con amminoacidi facenti parte della tasca di legame. GLU563, PRO665, PHE560, ALA825, SER830, SER831, ALA834, GLU833, GLY674. Ci sono 4 legami a idrogeno, il numero più elevato visto fino ad ora.

6.2.1 Docking di 1972 S con PA7

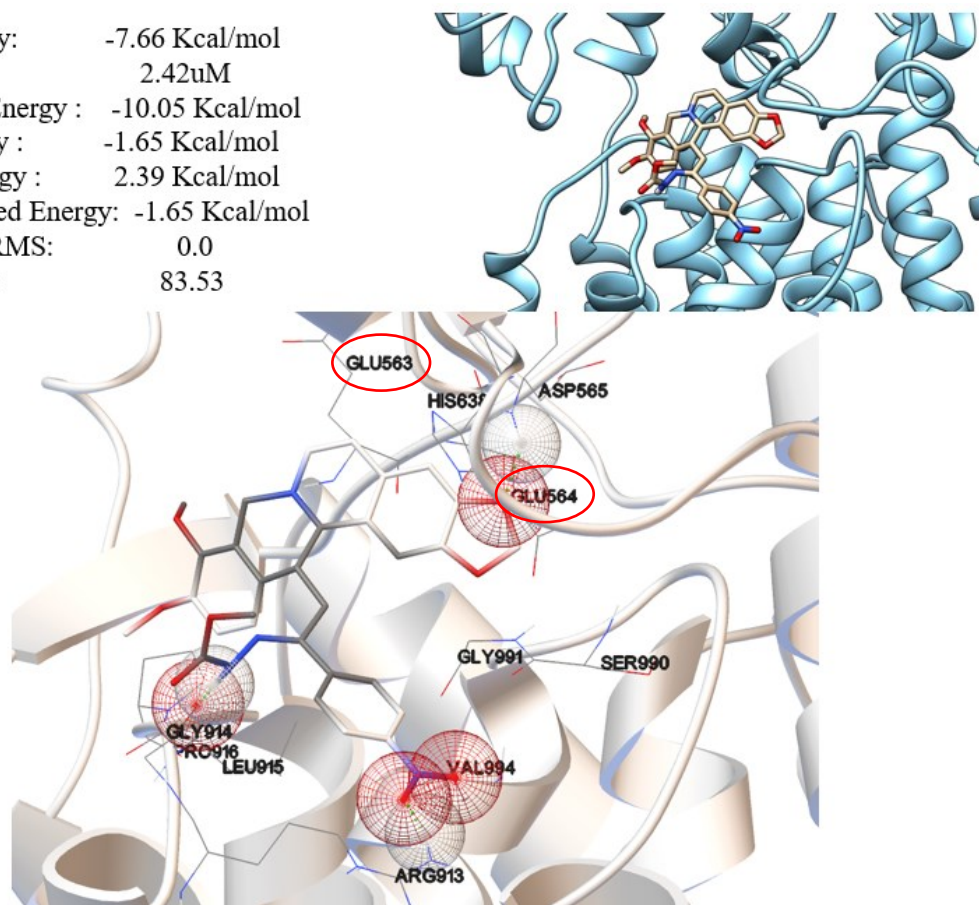
Binding Energy: -9.22 Kcal/mol
kI : 175.23uM
Intermolecular Energy : -11.6 Kcal/mol
Internal Energy : -2.62 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.62 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 132.37



L'enantiomero S di 1972 ha energia di binding leggermente minore rispetto al suo corrispettivo ma è comunque rilevante. Interazioni: SER673, PRO664, PHE560, PRO562, ALA825. I legami a idrogeno sono due.

6.2.2 Docking di 1972 S con AR48

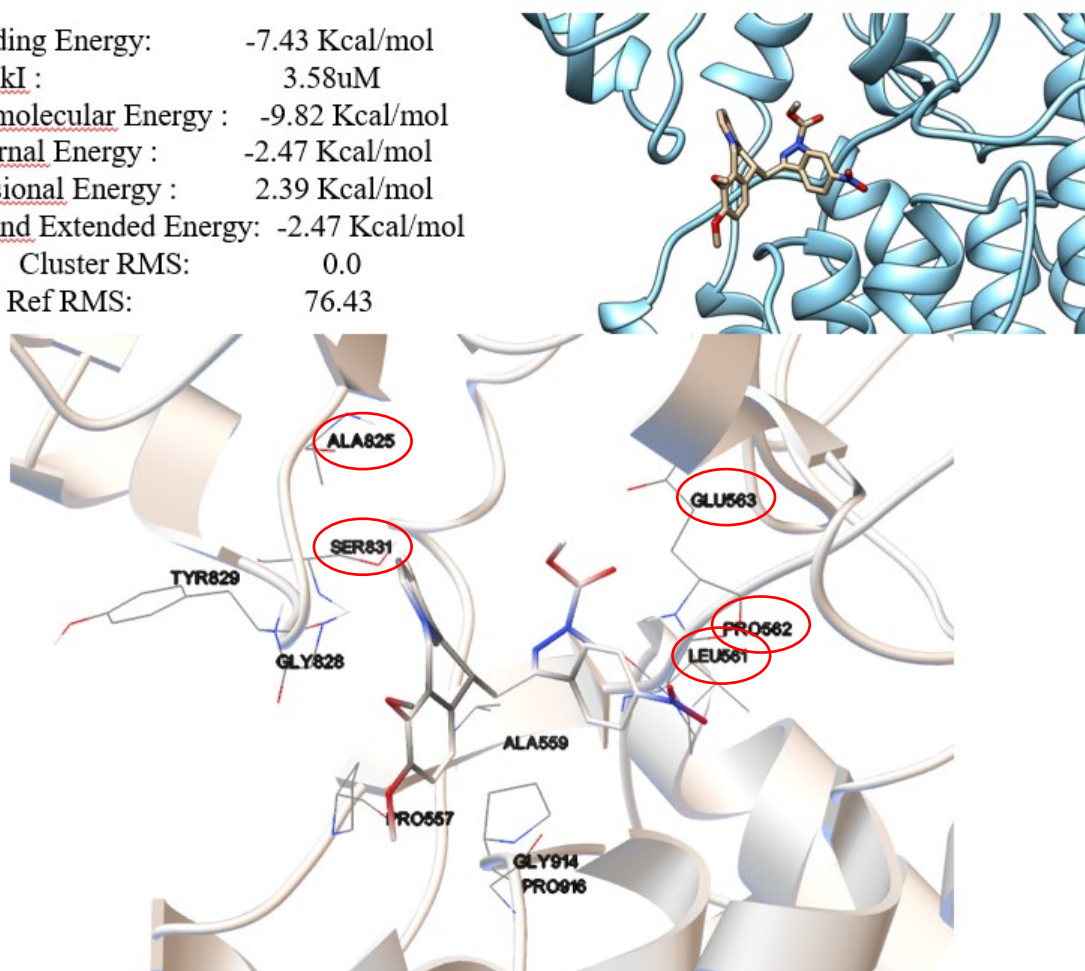
Binding Energy: -7.66 Kcal/mol
K_i: 2.42uM
Intermolecular Energy: -10.05 Kcal/mol
Internal Energy: -1.65 Kcal/mol
Torsional Energy: 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -1.65 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 83.53



Anche in questo caso il composto non mostra elevata compatibilità nei confronti del ceppo clinico AR48, sono presenti soltanto due interazioni: GLU563, GLU564. Unica nota positiva sono 3 legami a idrogeno, di cui 1 presente a livello degli amminoacidi del sito allosterico.

6.2.3 Docking di 1972 S con AR86

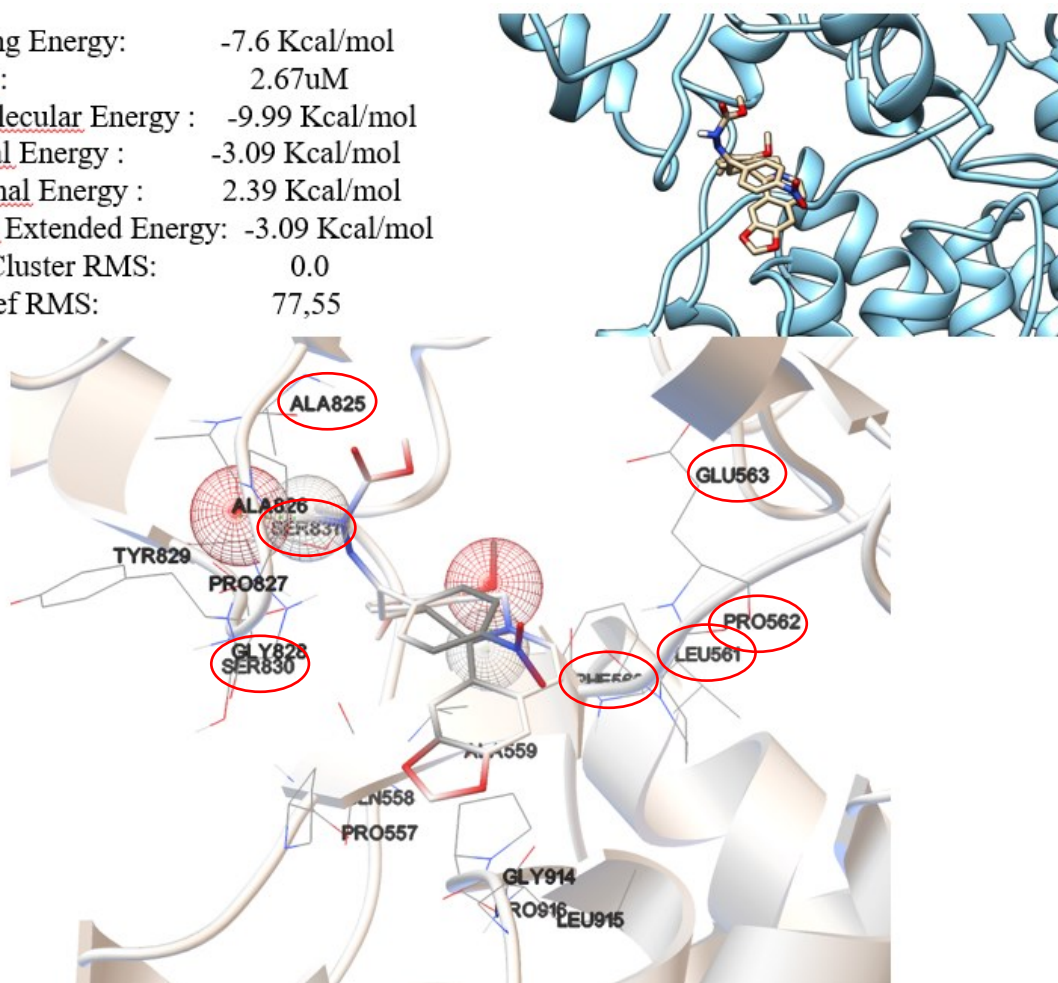
Binding Energy: -7.43 Kcal/mol
kI : 3.58uM
Intermolecular Energy : -9.82 Kcal/mol
Internal Energy : -2.47 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.47 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 76.43



Con AR86 l'energia di binding è addirittura leggermente minore di AR48, ci sono 3 interazioni in più ma nessun legame a idrogeno. Interazioni: PRO562, GLU563, LEU561, ALA825, SER831.

6.2.4 Docking di 1972 S con C15

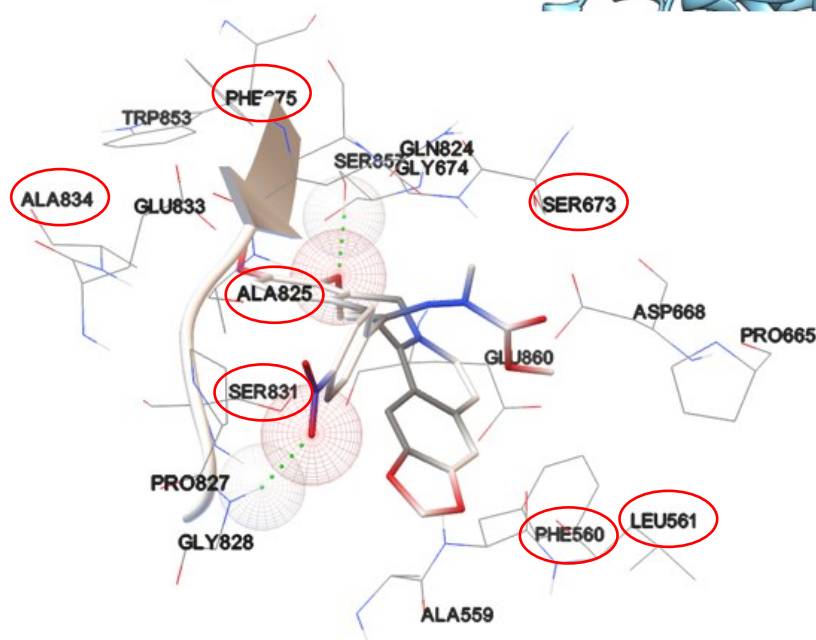
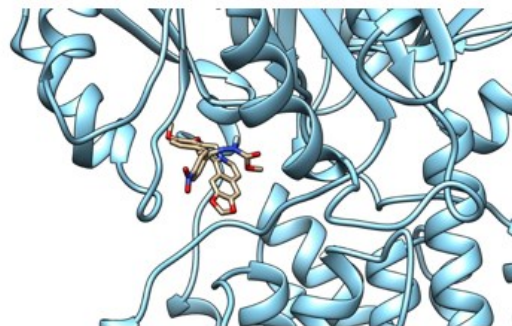
Binding Energy: -7.6 Kcal/mol
kI : 2.67uM
Intermolecular Energy : -9.99 Kcal/mol
Internal Energy : -3.09 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -3.09 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 77,55



Sono presenti numerose interazioni con gli amminoacidi della tasca, l'energia non è molto elevata. Interazioni: PHE560, LEU561, PRO562, GLU563, ALA825, SER830, SER831. È presente un legame a idrogeno.

6.2.5 Docking di 1972 S con NC04

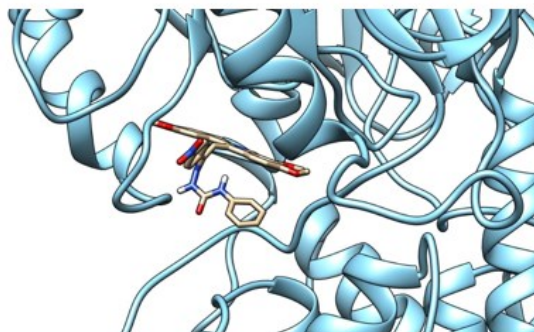
Binding Energy:	-8.97 Kcal/mol
K _I :	264.62uM
Intermolecular Energy :	-11.36 Kcal/mol
Internal Energy :	-2.58 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-2.58 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	70,5



Anche in questo caso, la pompa di efflusso di NC04 si conferma la più compatibile con il ligando in esame. Con un elevato numero di interazioni e un'energia di binding di quasi -9 Kcal/mol l'enantiomero S si prospetta un promettente candidato per l'inibizione di questa pompa di efflusso. Interazioni: PHE560, LEU561, SER673, ALA825, SER831, ALA834, PHE675. Ci sono due legami a idrogeno.

6.3.1 Docking di 1994 R con PA7

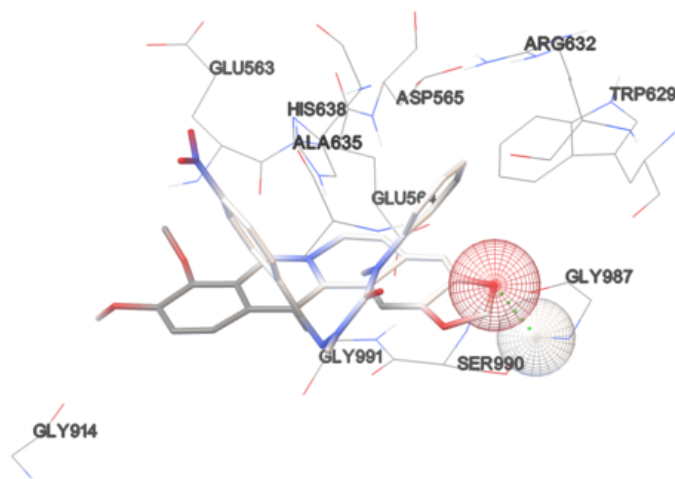
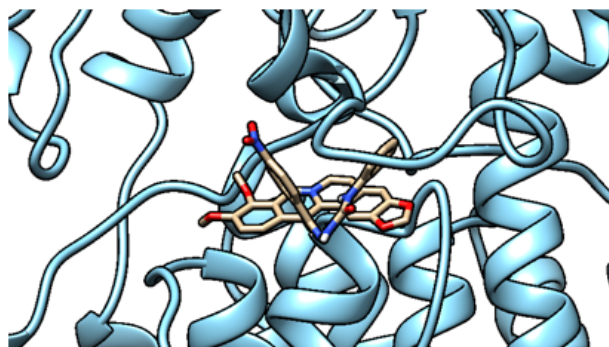
Binding Energy:	-10.4 Kcal/mol
<u>kl</u> :	23.61uM
Intermolecular Energy :	-12.79 Kcal/mol
Internal Energy :	-2.69 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-2.69 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	19.97



Come ampiamente previsto, l'interazione dell'enantiomero R del composto 1994 con PA7 è molto elevata, ci sono anche numerose interazioni con gli amminoacidi del sito allosterico: PHE560, LEU561, PRO562, SER673, GLY674, PHE675, ALA825, GLU833, SER830, SER831. Unica pecca, non è presente nessun legame a idrogeno.

6.3.2 Docking di 1994 R con AR48

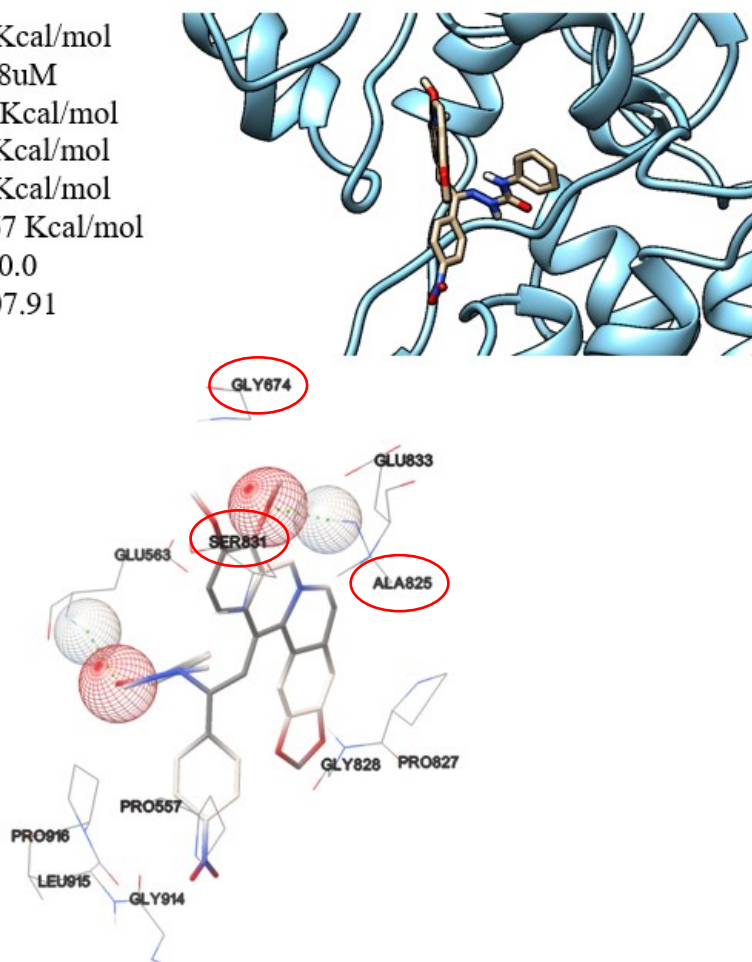
Binding Energy:	-8.61 Kcal/mol
<u>kI</u> :	488.19uM
<u>Intermolecular Energy</u> :	-11.0 Kcal/mol
<u>Internal Energy</u> :	-3.19 Kcal/mol
<u>Torsional Energy</u> :	2.39 Kcal/mol
<u>Unbound Extended Energy</u> :	-3.19 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	108.3



Anche in questo caso, con AR48, non c'è nessuna interazione con amminoacidi del sito allosterico. È presente un legame a idrogeno.

6.3.3 Docking di 1994 R con AR86

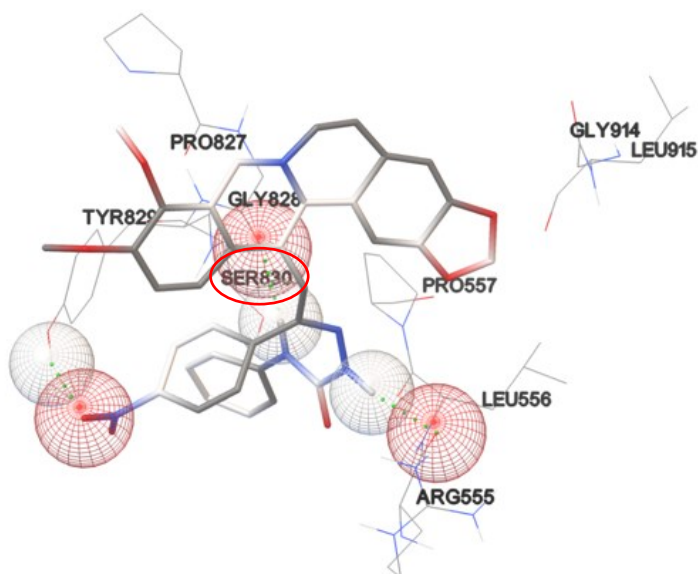
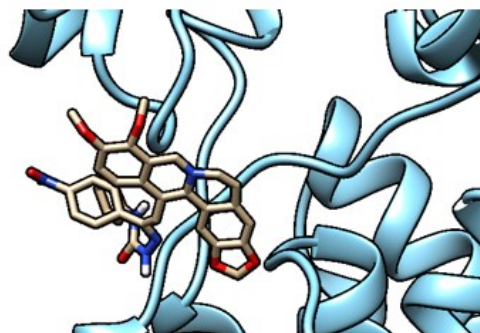
Binding Energy: -7.12 Kcal/mol
kI: 6.08uM
Intermolecular Energy: -9.5 Kcal/mol
Internal Energy: -2.67 Kcal/mol
Torsional Energy: 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.67 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 107.91



Il docking di questo composto con AR86 ha dato scarsi risultati, la migliore posa di binding ha energia poco più superiore a -7 Kcal/mol ed interagisce con solo tre amminoacidi della tasca: GLY674, SER831, ALA825. Ci sono due legami a idrogeno.

6.3.4 Docking di 1994 R con C15

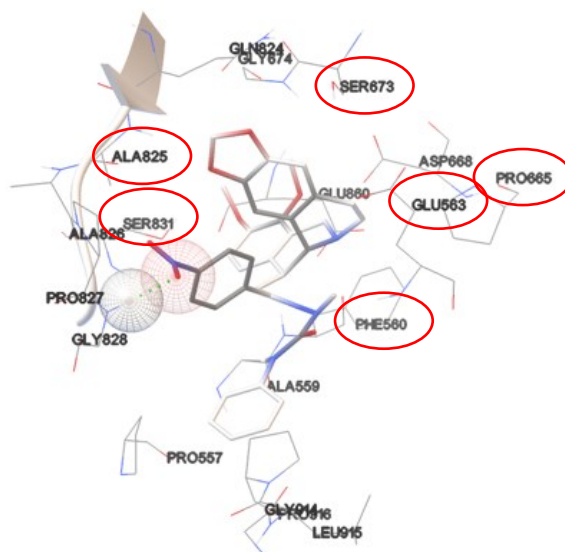
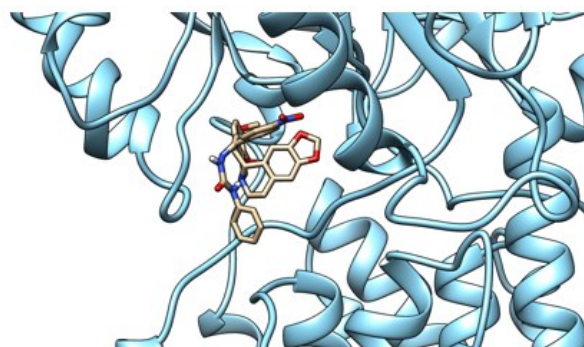
Binding Energy: -7.44 Kcal/mol
kI : 3.52uM
Intermolecular Energy : -9.83 Kcal/mol
Internal Energy : -2.64 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.64 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 111.25



Anche con C15 sono stati ottenuti scarsissimi risultati, analoghi al precedente docking. Interazione: SER830. Sono presenti tre legami a idrogeno; questo dato a mio parere potrebbe essere interessante: sono presenti numerosi legami a idrogeno in zone di interazione con amminoacidi limitrofi, ciò significa che, anche in casi di bassa energia di binding, il ligando ha comunque elevata affinità con tutti gli amminoacidi presenti nella zona centrale della proteina. La cosa importante, però, è il suo comportamento e, a mio parere, questa posa è comunque troppo esterna al sito allosterico, di conseguenza potrebbe non essere pienamente funzionale.

6.3.5 Docking di 1994 R con NC04

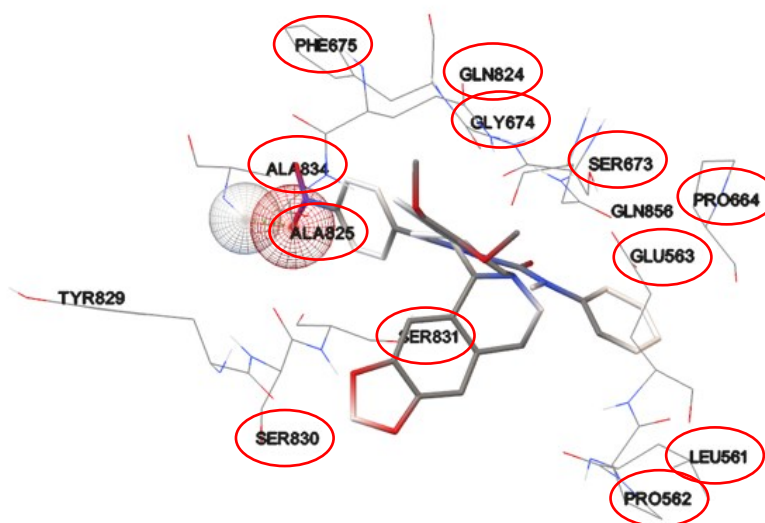
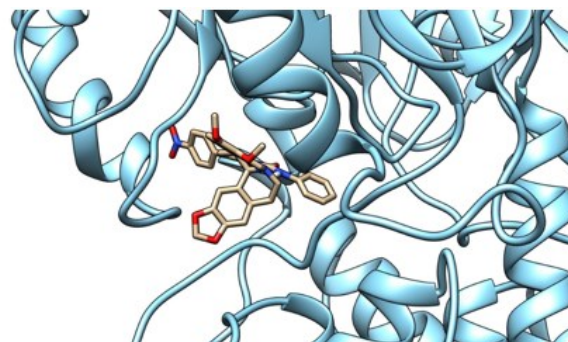
Binding Energy:	-9.7 Kcal/mol
<u>kI</u> :	78.07uM
Intermolecular Energy :	-12.08 Kcal/mol
Internal Energy :	-2.64 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-2.64 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	3.01



Contrariamente a quello che è stato visto nei precedenti docking, il ligando ha elevata affinità per il sito allosterico di NC04 rendendo questo ceppo l'unico rilevante per futuri approfondimenti che verranno affrontati nell'ultima parte di questa tesi. Interazioni: PRO665, PHE560, GLU563, SER673, ALA825, SER831. Un solo legame a idrogeno è presente.

6.4.1 Docking di 1994 S con PA7

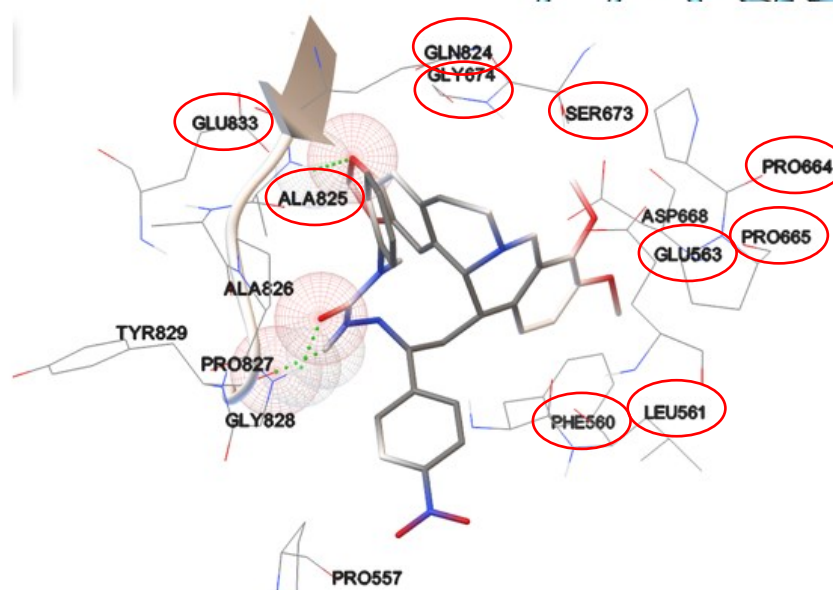
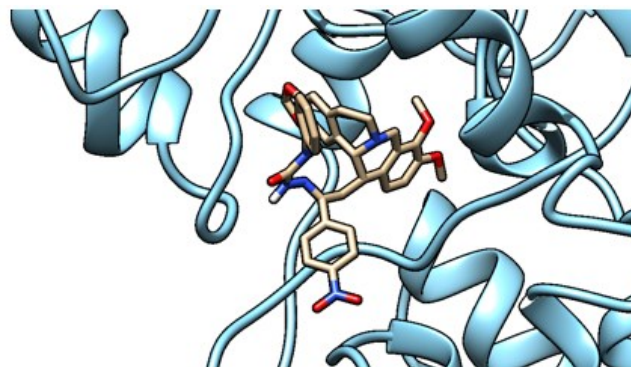
Binding Energy:	-10.96 Kcal/mol
<u>kI</u> :	9.22uM
Intermolecular Energy :	-13.35 Kcal/mol
Internal Energy :	-1.9 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-1.9 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	145.96



Anche nel caso dell'enantiomero S del composto 1994, c'è una elevata energia di legame che rasenta i -11 Kcal/mol e tutte le interazioni, ad eccezione di due, sono con amminoacidi presenti nella tasca di legame: LEU561, PRO562, GLU563, PRO664, SER673, GLY674, PHE675, GLN824, ALA825, SER830, SER831, ALA834. È presente un solo legame a idrogeno. Fino ad ora questo è il miglior docking riscontrato ed il composto 1994S ha le potenzialità per essere il migliore.

6.4.2 Docking di 1994 S con AR48

Binding Energy:	-10.2 Kcal/mol
K _I :	33.37uM
Intermolecular Energy :	-12.59 Kcal/mol
Internal Energy :	-2.72 Kcal/mol
Torsional Energy :	2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy:	-2.72 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	76.08

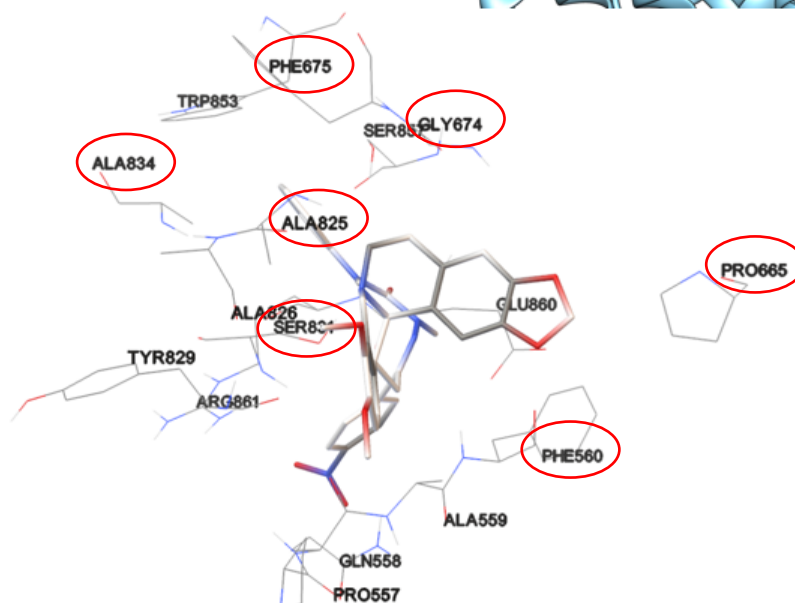
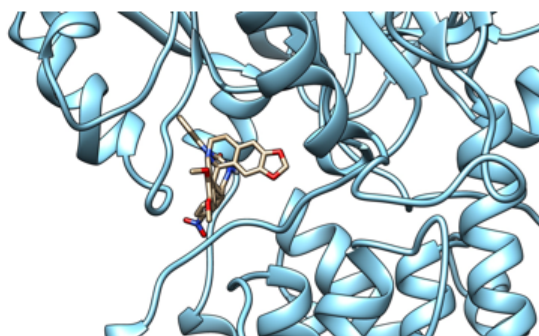


Nel caso del ceppo clinico AR48 è la prima volta che si riscontra un'energia di legame al di sopra dei -10 Kcal/mol, anche le interazioni sono numerose: PHE560, LEU561, GLU563, PRO665, SER673, GLY674, GLN824, ALA825, GLU833. La cosa che subito salta all'occhio è che le interazioni con gli aminoacidi della tasca sono rivolte solo verso la parte interna della molecola mentre nella parte esterna ci sono altre interazioni con aminoacidi esterni che però presentano due

dei tre legami a idrogeno presenti, probabilmente questi legami a idrogeno vicini hanno contribuito all'aumento dell'energia di legame.

6.4.3 Docking di 1994 S con AR86

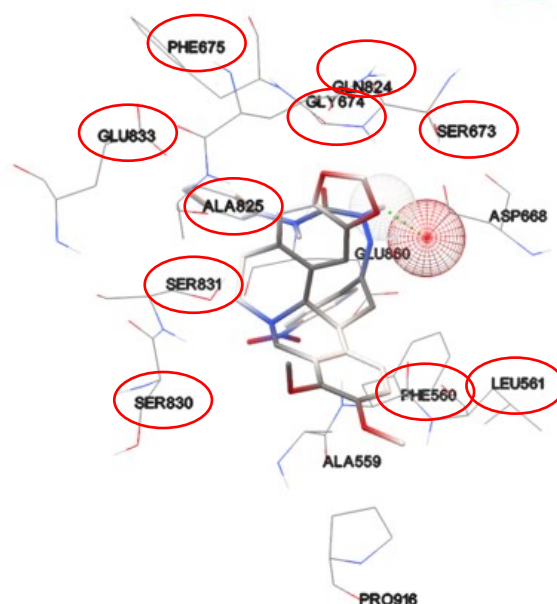
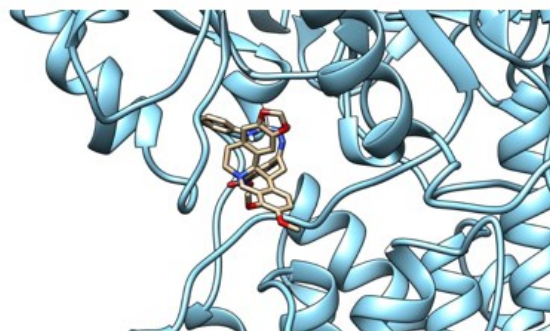
Binding Energy:	-10.35 Kcal/mol
<u>KI</u> :	25.82uM
<u>Intermolecular Energy</u> :	-12.74 Kcal/mol
<u>Internal Energy</u> :	-1.98 Kcal/mol
<u>Torsional Energy</u> :	2.39 Kcal/mol
<u>Unbound Extended Energy</u> :	-1.98 Kcal/mol
Cluster RMS:	0.0
Ref RMS:	69.21



Anche in questo caso, l'energia di legame è molto più elevata rispetto ai precedenti docking con questo ceppo clinico, le interazioni però sono leggermente minori: PHE560, PRO665, GLY674, PHE675, ALA825, SER831, ALA834. Non è presente nessun legame a idrogeno.

6.4.4 Docking di 1994 S con C15

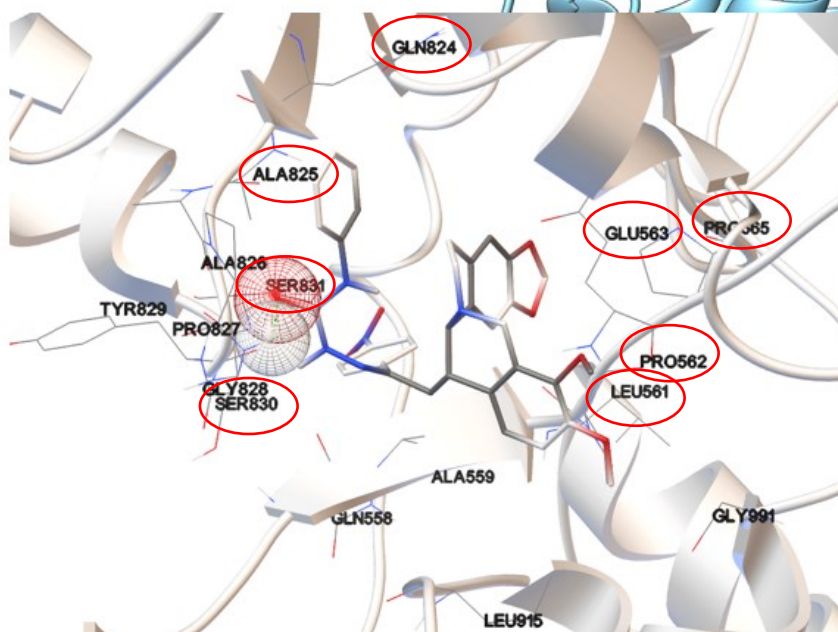
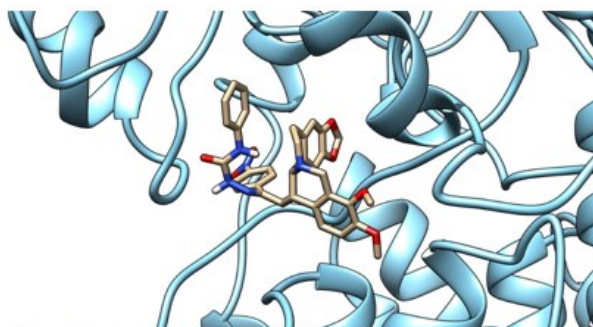
Binding Energy: -9.25 Kcal/mol
kI : 165.12uM
Intermolecular Energy : -11.64 Kcal/mol
Internal Energy : -2.71 Kcal/mol
Torsional Energy : 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.71 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 72.75



Questa posa di docking ha energia di legame minore rispetto alle precedenti, le interazioni sono numerose: PHE560, LEU561, SER673, GLY674, PHE675, ALA825, SER830, SER831, GLU833. È presente anche un legame a idrogeno.

6.4.5 Docking di 1994 S con NC04

Binding Energy: -9.08 Kcal/mol
K_i: 219.35uM
Intermolecular Energy: -11.47 Kcal/mol
Internal Energy: -2.93 Kcal/mol
Torsional Energy: 2.39 Kcal/mol
Unbound Extended Energy: -2.93 Kcal/mol
Cluster RMS: 0.0
Ref RMS: 75.69



Infine, con il ceppo clinico NC04 si presenta una stranezza; solitamente i migliori risultati provenivano sempre da questo ceppo clinico, con 1994S si riscontra invece la peggior energia di legame registrata nei docking con questo ligando, le interazioni sono comunque soddisfacenti: LEU561, PRO562, GLU563, PRO665, GLN824, ALA825, SER830, SER831. È presente un legame a idrogeno.

6.5 Resoconto

Alla fine del processo di docking molecolare è stato deciso di proseguire negli studi di dinamica molecolare con il ceppo PA7 e con il ceppo clinico NC04, valutato complessivamente il migliore tra i quattro ceppi clinici. In particolare, la dinamica è stata eseguita su PA7 ed NC04 con il composto 1994 mentre con il composto 1972 è stata eseguita solamente sul PA7.

<i>Kcal/mol</i>	PA7	AR48	AR86	C15	NC04
1994 R	-10.4	-8.61	-7.12	-7.44	-9.7
1994 S	-10.96	-10.2	-10.35	-9.25	-9.08
1972 R	-10.4	-9.49	-8.38	-7.93	-8.52
1972 S	-9.22	-7.66	-7.43	-7.6	-8.97

Tabella 7. Riassunto del processo di Docking molecolare con tutte le energie di legame registrate.

	E560	L561	P562	E563	E564	S611	P664	P665	L666	S673
1994 R – PA7										
1994 R – AR48										
1994 R – AR86										
1994 R – C15										
1994 R – NC04										
1994 S – PA7										
1994 S – AR48										
1994 S – AR86										
1994 S – C15										
1994 S – NC04										
1972 R – PA7										
1972 R – AR48										
1972 R – AR86										
1972 R – C15										
1972 R – NC04										
1972 S – PA7										

1972 S – AR48										
1972 S – AR86										
1972 S – C15										
1972 S – NC04										

	G674	F675	E822	Q824	A825	S830	S831	E833	A834	Q856
1994 R – PA7										
1994 R – AR48										
1994 R – AR86										
1994 R – C15										
1994 R – NC04										
1994 S – PA7										
1994 S – AR48										
1994 S – AR86										
1994 S – C15										
1994 S – NC04										
1972 R – PA7										
1972 R – AR48										
1972 R – AR86										
1972 R – C15										
1972 R – NC04										
1972 S – PA7										
1972 S – AR48										
1972 S – AR86										
1972 S – C15										
1972 S – NC04										

Tabella 8. *Mappatura delle interazioni di ogni posa di docking con gli amminoacidi presenti nel sito allosterico. Il colore verde indica una semplice interazione, il colore rosso sta ad indicare che quell'amminoacido partecipa anche ad un legame a idrogeno.*

Capitolo settimo

RISULTATI DI DINAMICA MOLECOLARE

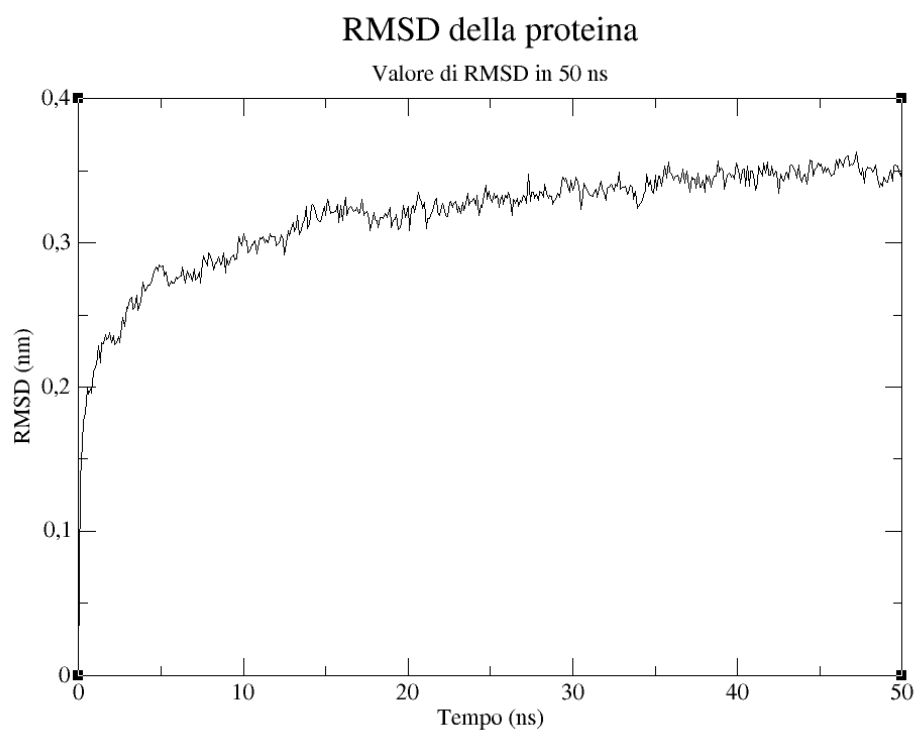
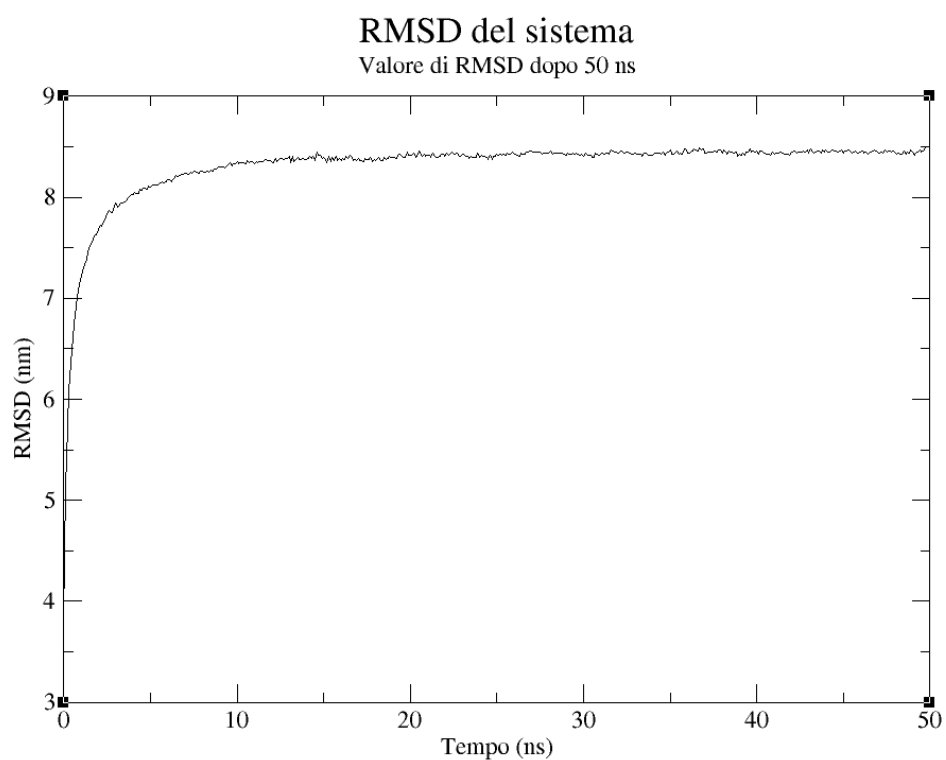
7.0 Parametri utilizzati per la dinamica molecolare

Il processo di dinamica molecolare è iniziato con la costruzione dei file necessari alla piattaforma CHARMM-GUI: inizialmente è stato assegnato un nome differente ai due composti (BNO per il 1994 ed NNO per il 1972); in seguito, partendo dal file *pdb 2v50*⁹⁶, è stato costruito *ad-hoc* il file del trimero della pompa di efflusso MexXY-OprM attraverso un processo di matchmaking in Chimera e il suddetto file è stato caricato su CHARMM-GUI per costruire i file necessari all'esecuzione degli step di dinamica molecolare in GROMACS. Le dinamiche sono state simulate tutte per 50 ns e sono state valutate visivamente attraverso il software VMD, mentre GROMACS è stato utilizzato per calcolare gli RMSD di intero sistema, proteina, ligandi del trimero e tasche di legame di ogni monomero. L'RMSD (*Root Mean Square Deviation*) è un parametro che permette di ottenere quantitativamente la similarità tra due coordinate atomiche, è calcolato attraverso questa formula:

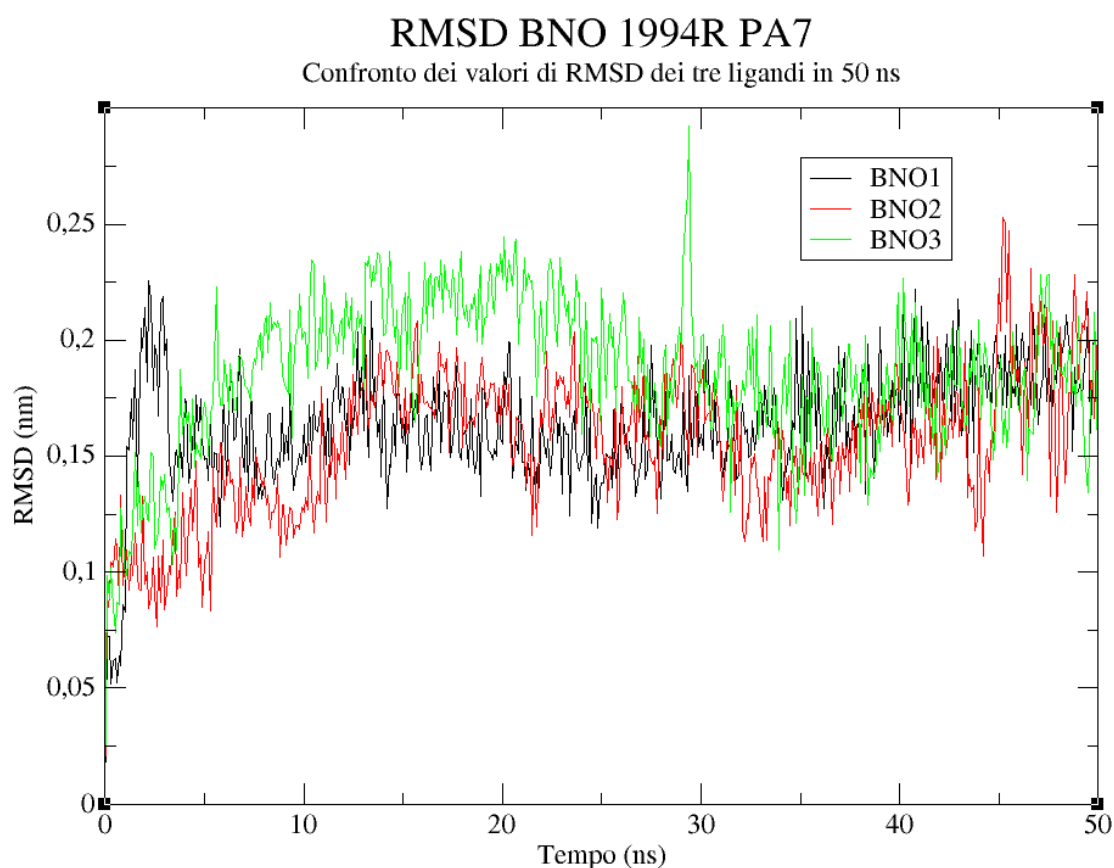
$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}$$

97.

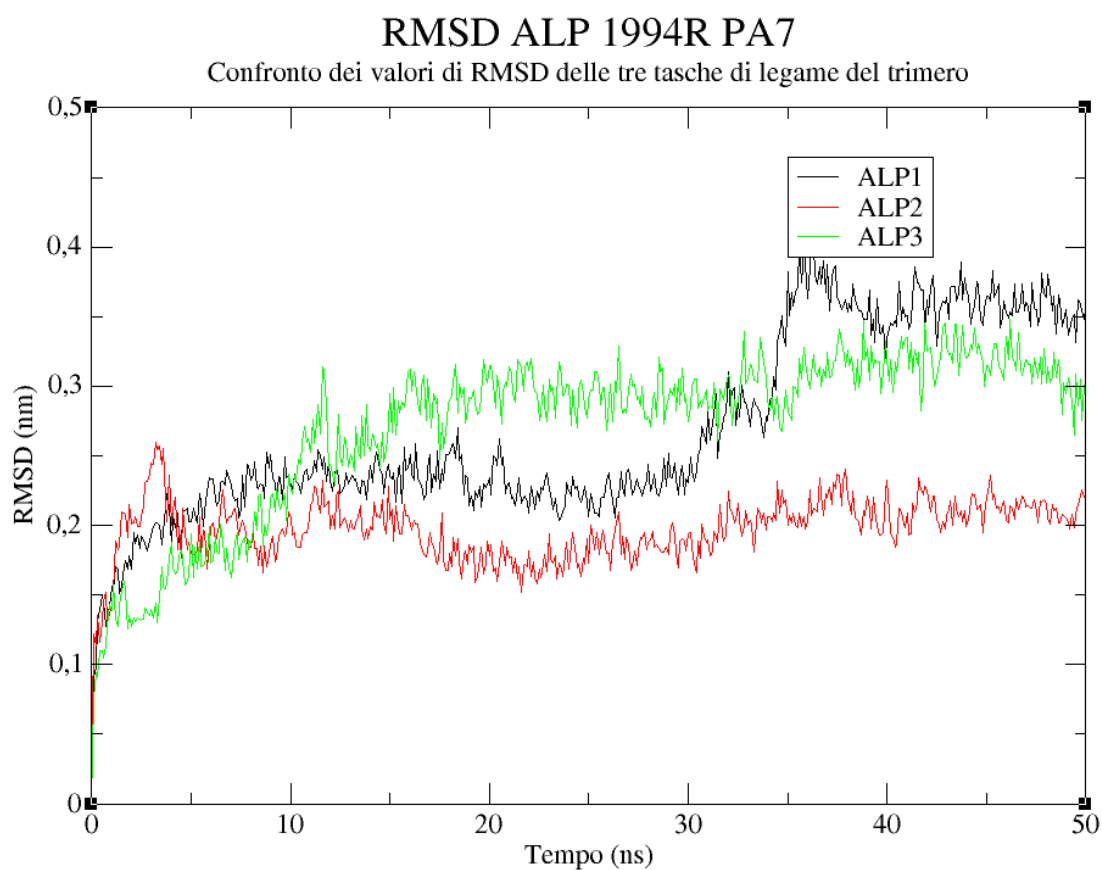
7.1.1 Dinamica molecolare di 1994 R su PA7



Questi primi due grafici indicano l'RMSD ottenuto dall'intero complesso proteina-ligando e dalla proteina presa singolarmente. Si può notare come in 50 ns restano entrambi stabili, soprattutto l'intero sistema.

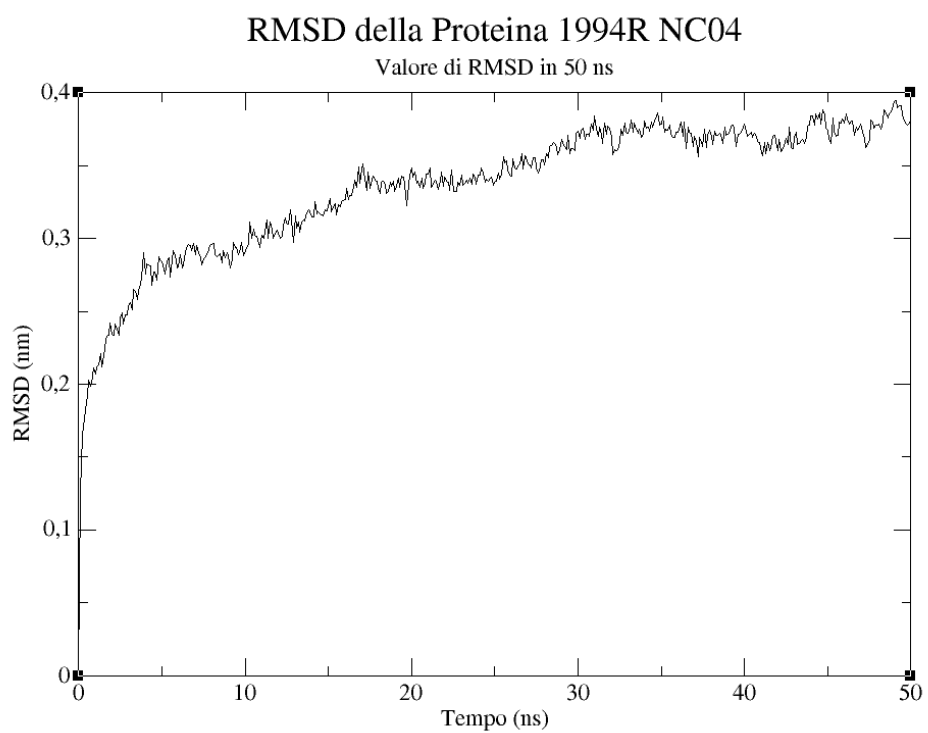
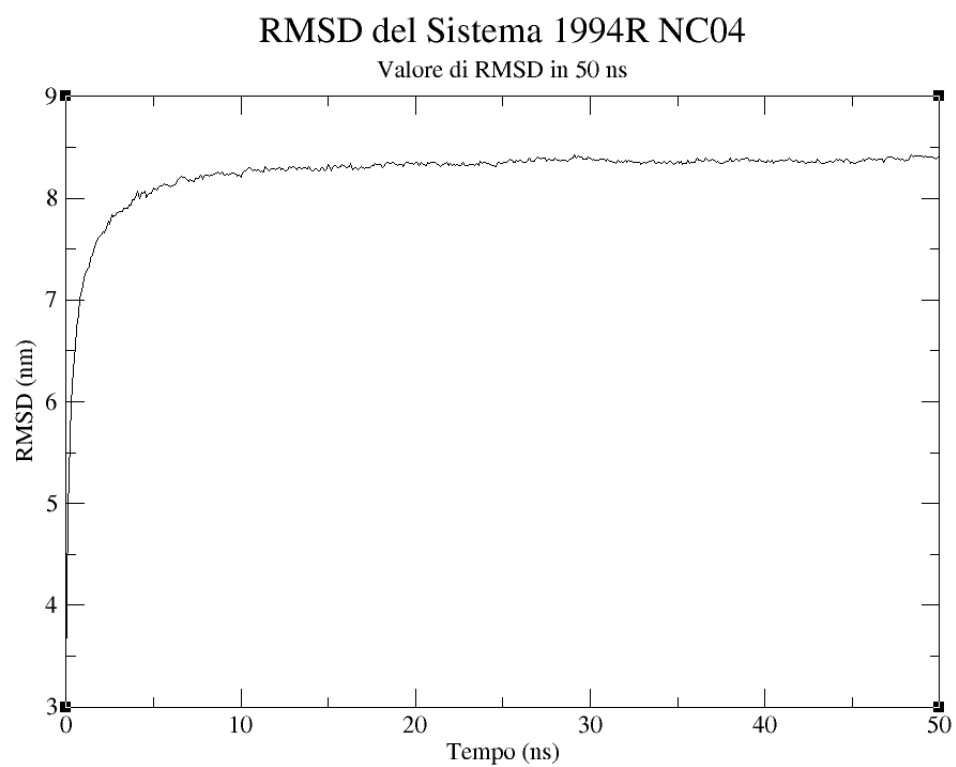


Questo grafico misura la stabilità di tutti e tre i ligandi all'interno delle tre tasche di legame del trimero. In questo caso il ligando che ha meno oscillazione del valore di RMSD è BNO2 che subisce grosse oscillazioni di valore soltanto verso gli ultimi 5 ns della simulazione. Il ligando più stabile verrà preso in considerazione per ulteriori analisi che verranno affrontate successivamente all'interno di questa tesi.

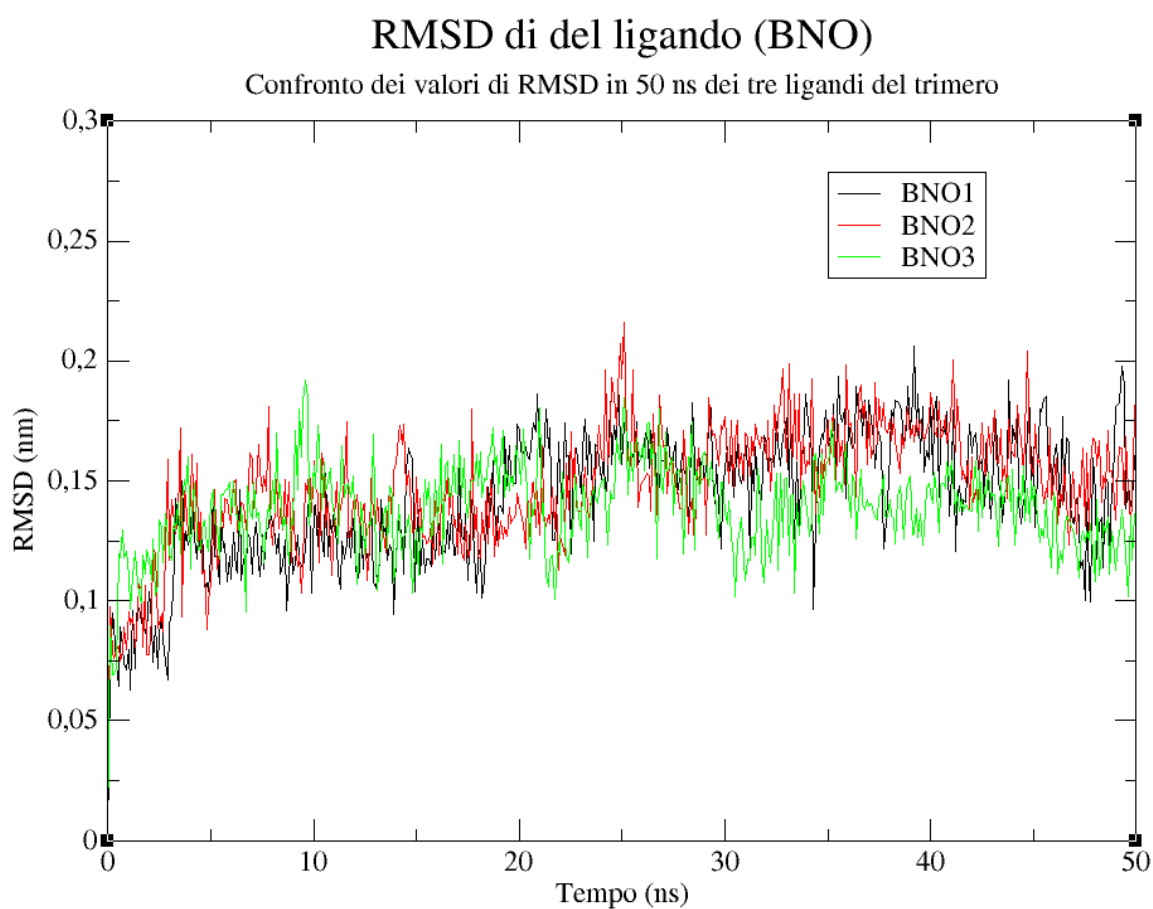


Questo grafico, invece, è la misura della stabilità di tutti gli amminoacidi facenti parte della tasca di legame (il sito allosterico indicato, appunto, con ALP). In questo caso ALP2 è la tasca più stabile tra le tre. Da notare che la tasca corrisponde con BNO2 che era stato individuato come ligando più stabile.

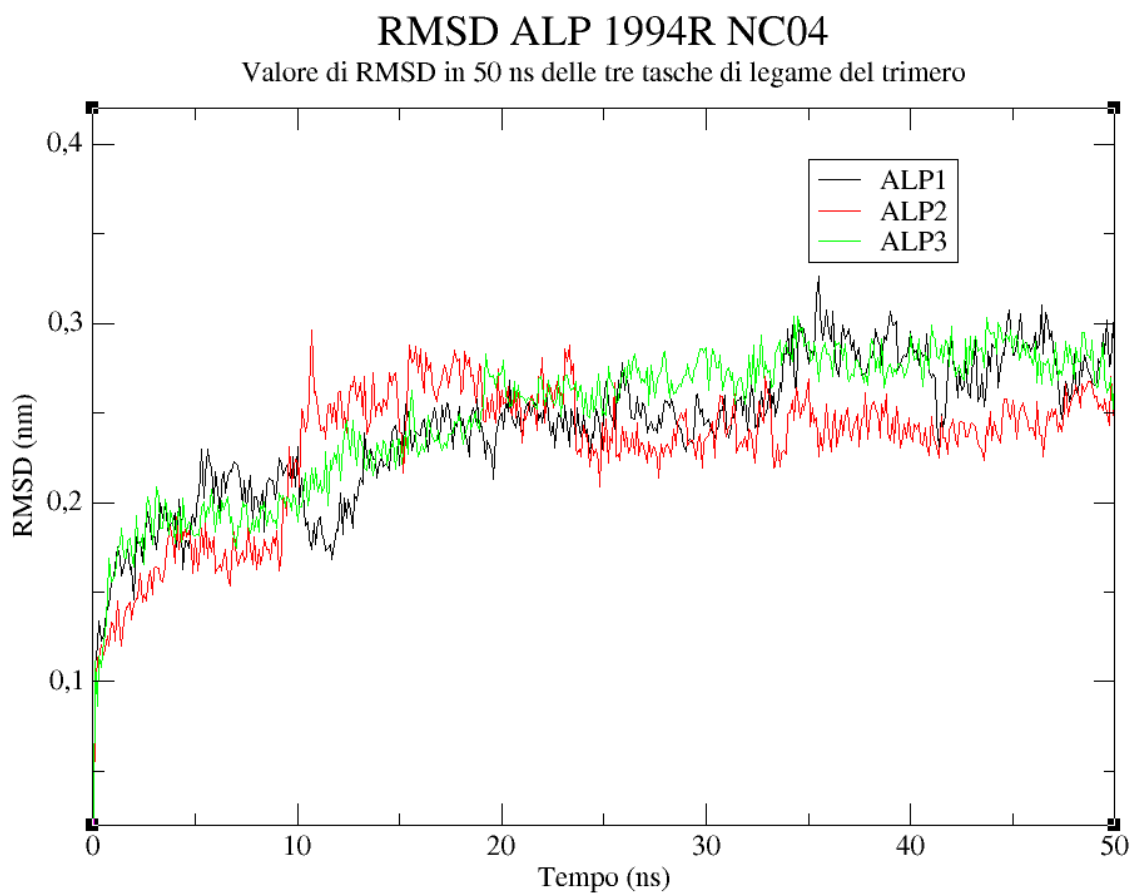
7.1.2 Dinamica di 1994 R su NC04



Dai due grafici si evince che l'intero sistema si stabilizza dopo circa 5 ns e resta costante fino alla fine della dinamica. Anche l'RMSD della proteina è molto soddisfacente: in 50 ns si parte da circa 0,2 nm fino ad arrivare a quasi 0,4 nm.

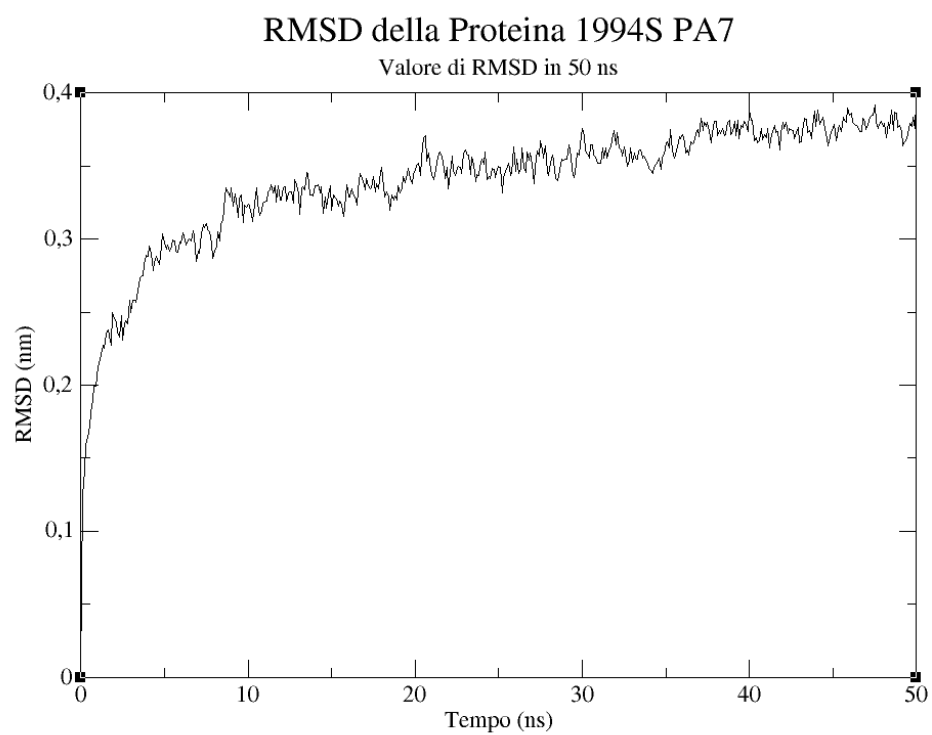
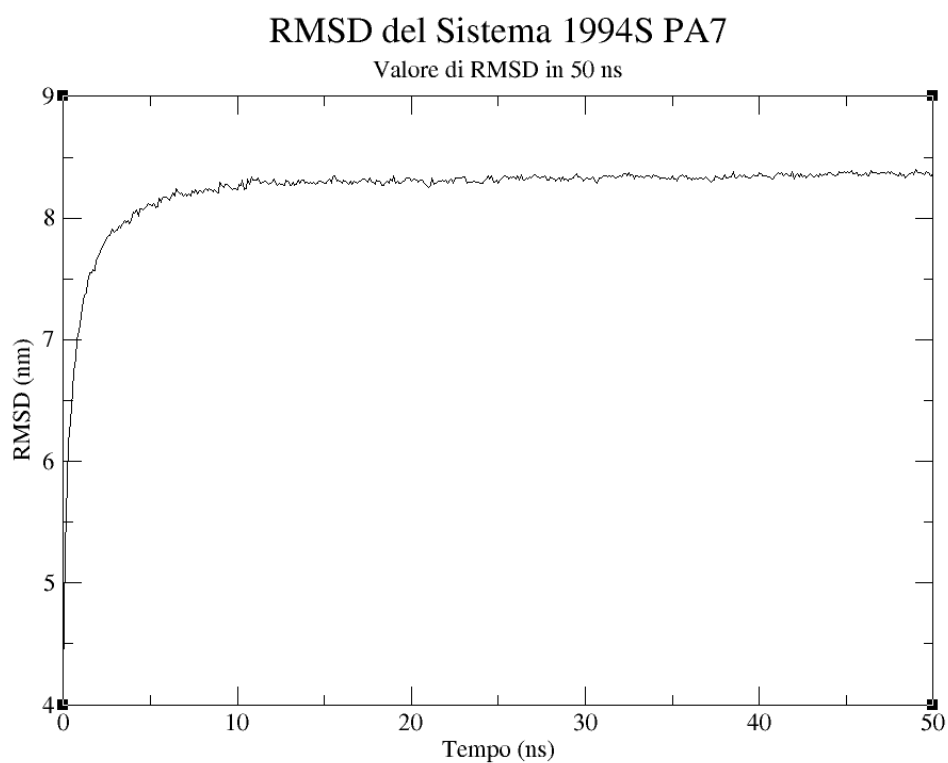


I tre ligandi sono tutti molto stabili e simili tra loro con valori di RMSD quasi sovrapponibili.

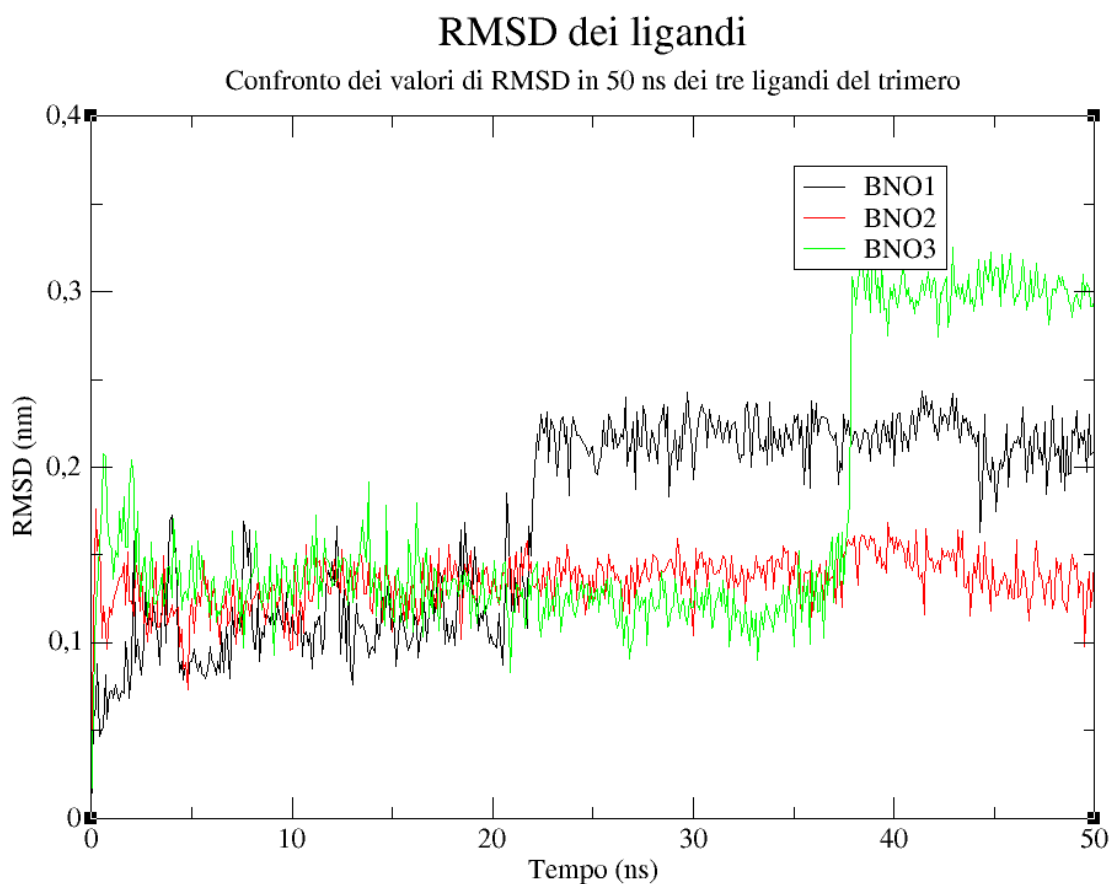


Valori di RMSD molto soddisfacenti sono stati ottenuti anche per quanto riguarda i soli amminoacidi facenti parte della tasca di legame (ALP o *cleft*), si nota come il terzo monomero sia un po' più stabile rispetto agli altri.

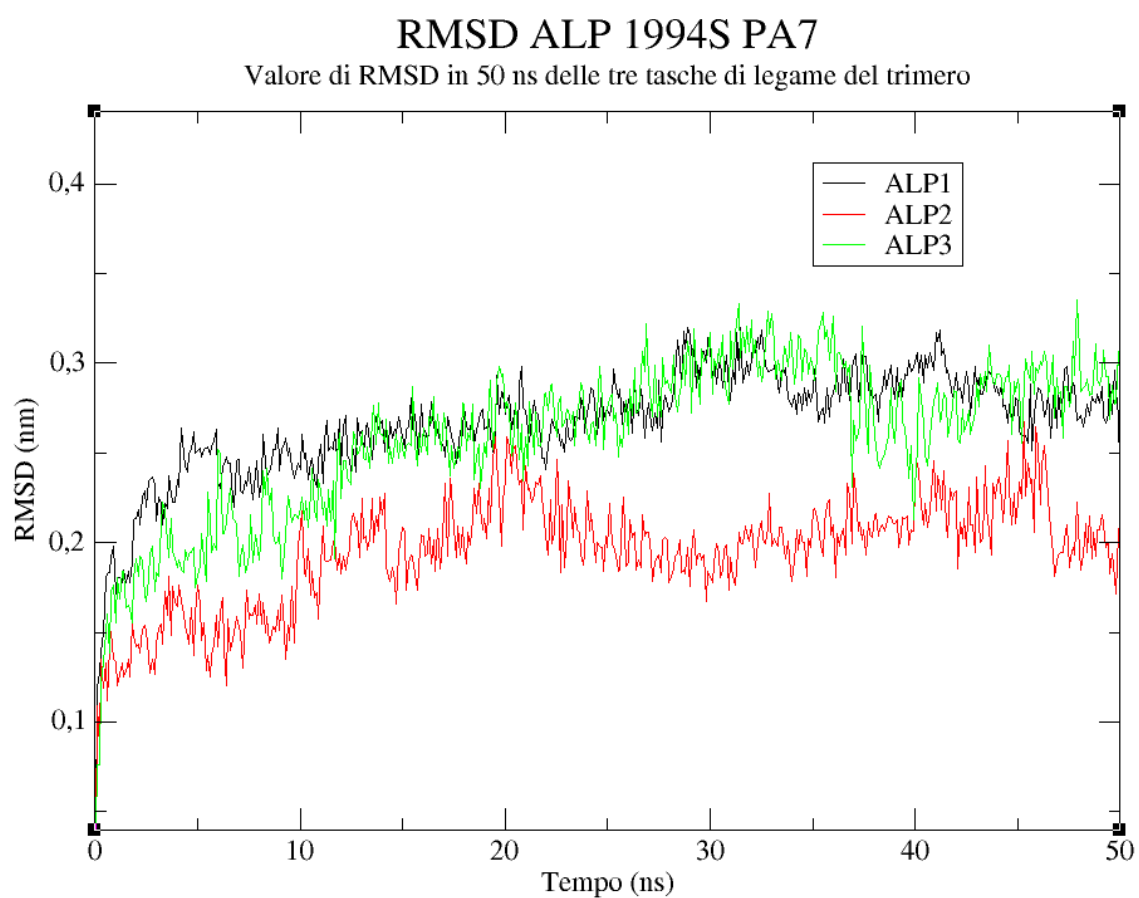
7.1.3 Dinamica molecolare di 1994 S su PA7



Anche in questo caso, il comportamento del sistema è sovrapponibile alla dinamica precedente, stesso discorso vale anche per la proteina.

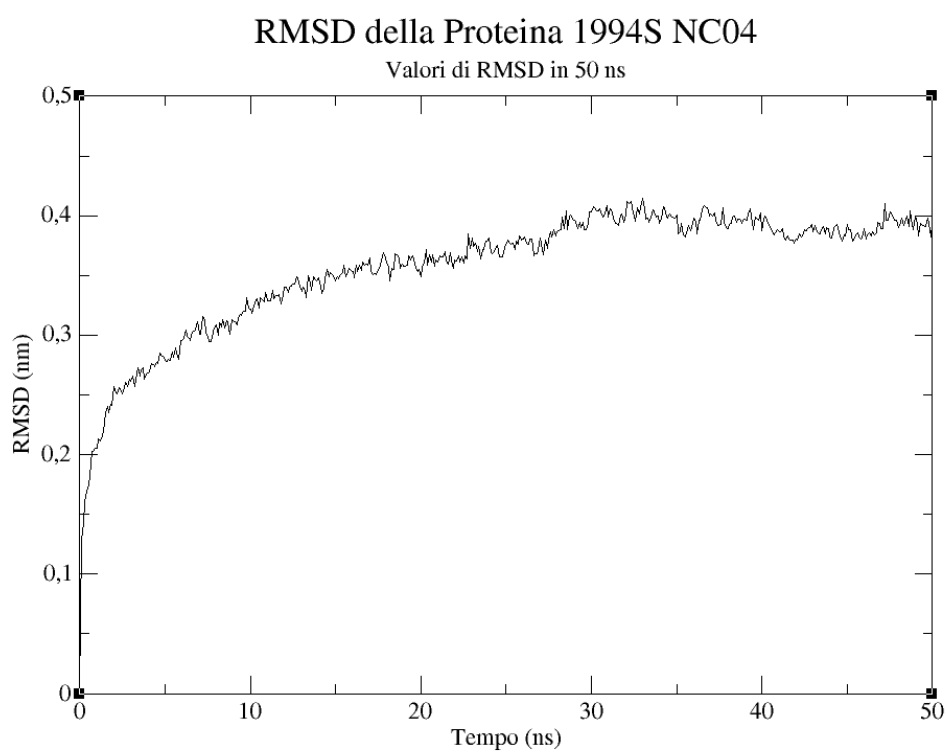
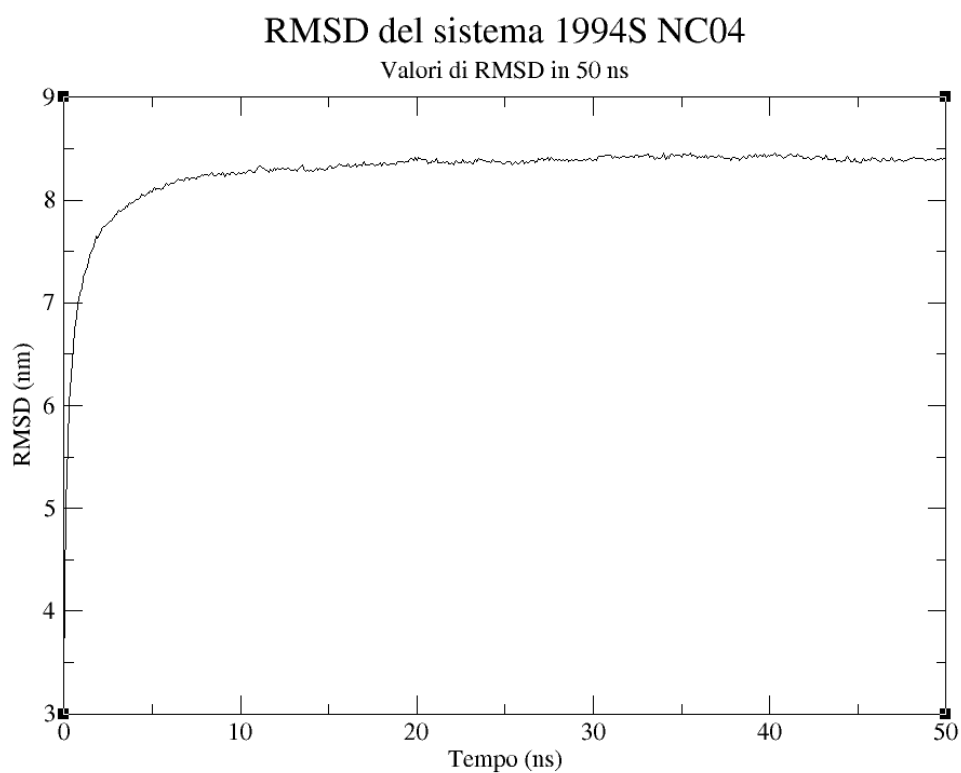


Il discorso è differente per quanto riguarda i ligandi, sia nel primo che nel terzo ligando ci sono repentini innalzamenti del valore di RMSD, soprattutto nel terzo dove in circa 2 ns passa da un valore di 0,15 nm a circa 0,3 nm. Il ligando più stabile è senza dubbio BNO2.

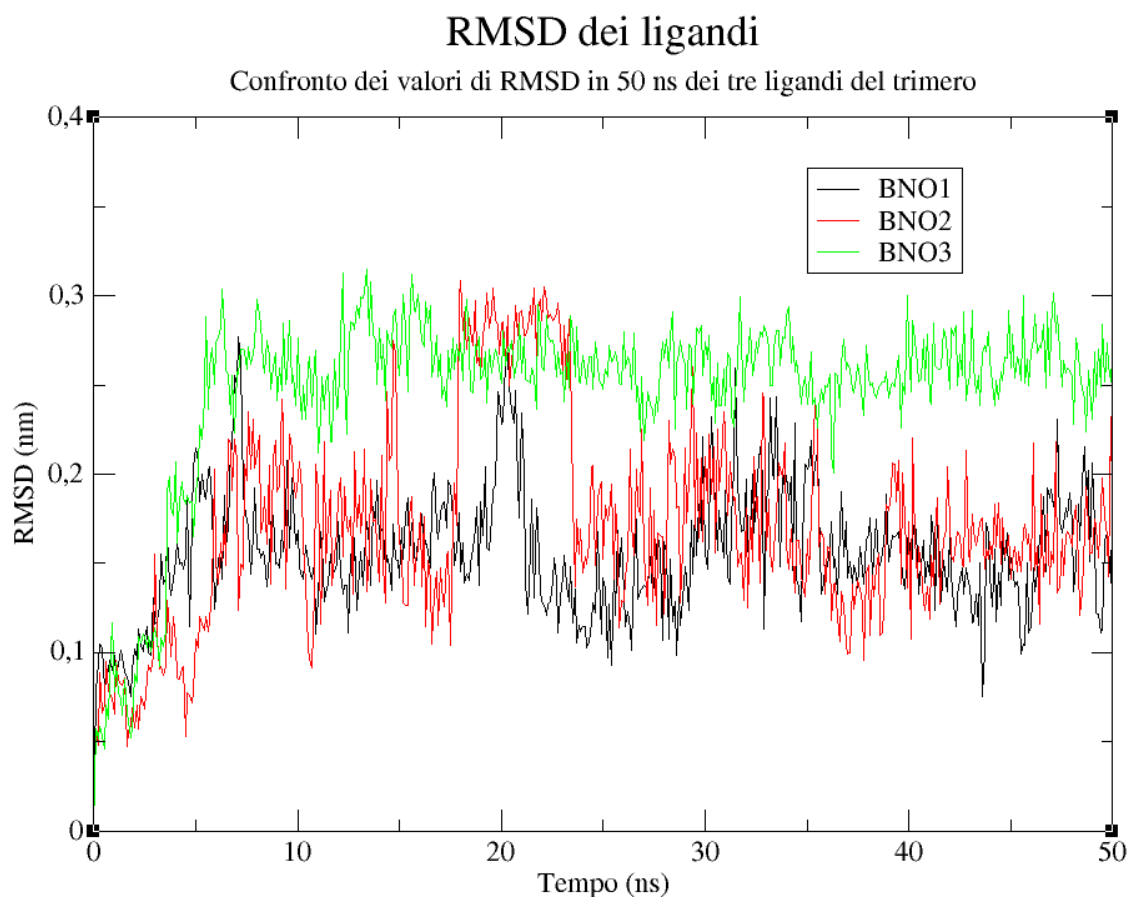


L'andamento si rispecchia anche nelle tasche di legame, infatti BNO1 e BNO3 hanno valori di RMSD più alti rispetto a BNO2 che era il ligando più stabile. Tutte e tre le tasche di legame sono comunque molto stabili.

7.1.4 Dinamica molecolare di 1994 S su NC04

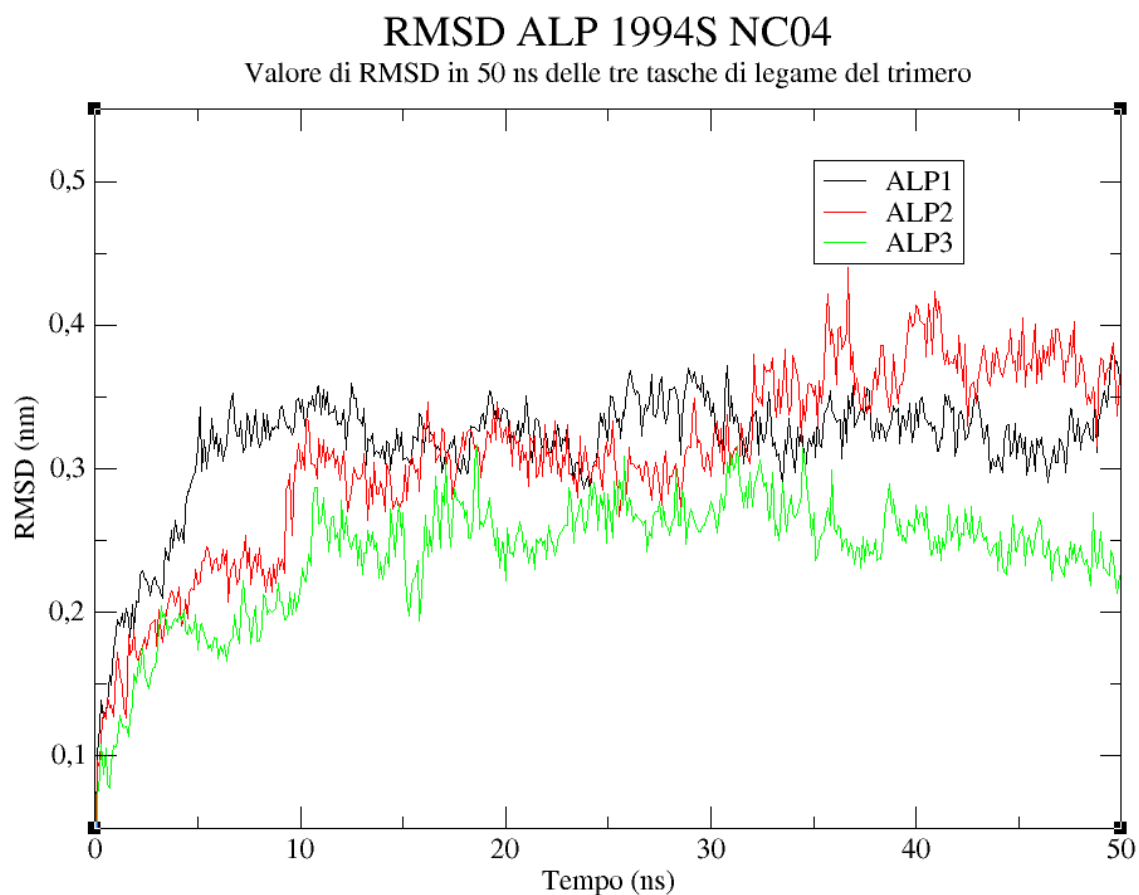


I valori ottenuti da sistema e proteina sono quasi sovrapponibili con quelli ottenuti con PA7, è quindi innegabile che il comportamento dell'intero sistema e della sola proteina è costante e si possono quindi considerare molto stabili.



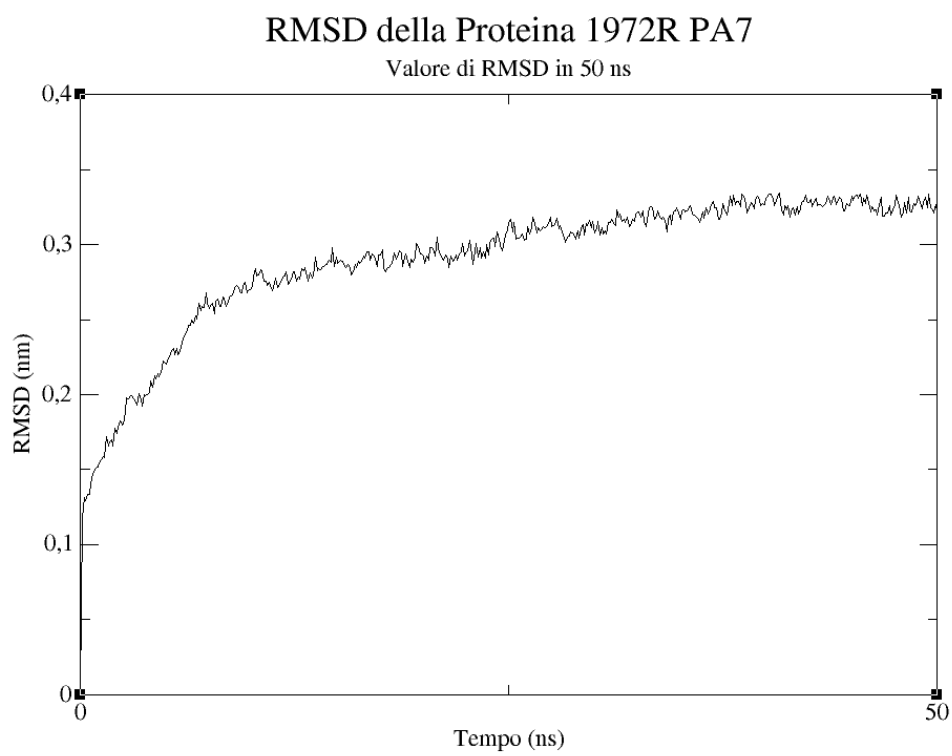
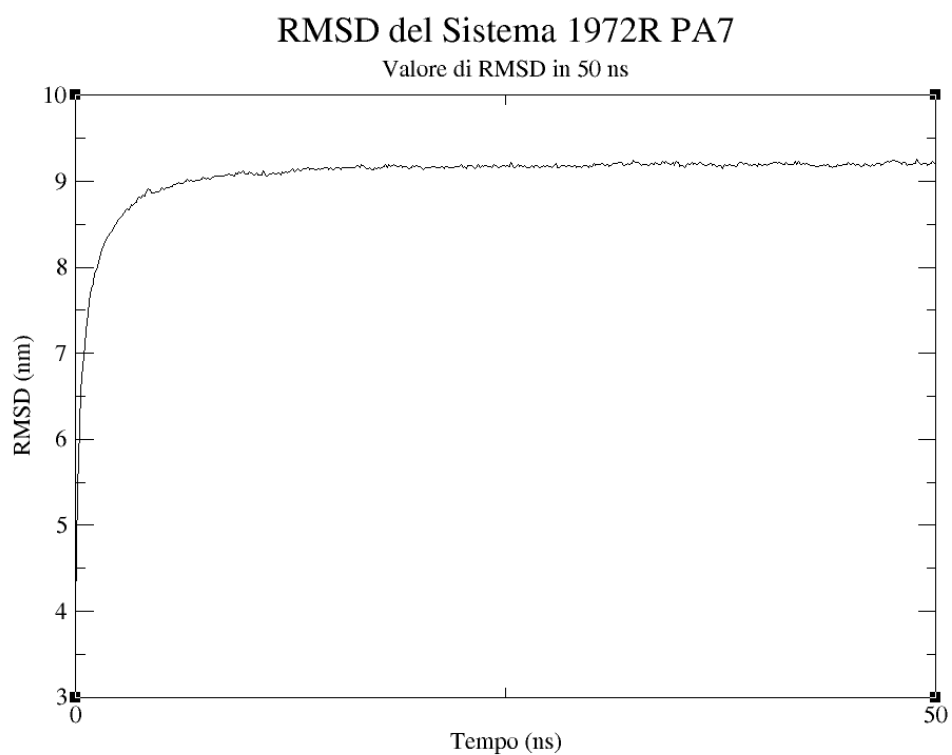
Come sempre, il comportamento dei ligandi, invece, è molto singolare: in questo caso notiamo meno stabilità rispetto alla dinamica eseguita su PA7; in BNO2, che precedentemente era il più stabile, notiamo una pesante oscillazione dopo quasi 20 ns in cui il valore di RMSD cambia repentinamente da meno di 0,15 nm fino a raggiungere gli 0,3 nm, permane così per circa 10 ns per poi ritornare nuovamente a valori più bassi. BNO1 ha molte oscillazioni ma quasi nessuna repentina, nessun

picco improvviso. BNO3 sale repentinamente nei primi 10 ns per poi rimanere stabile intorno agli 0,3 nm fino alla fine della simulazione.

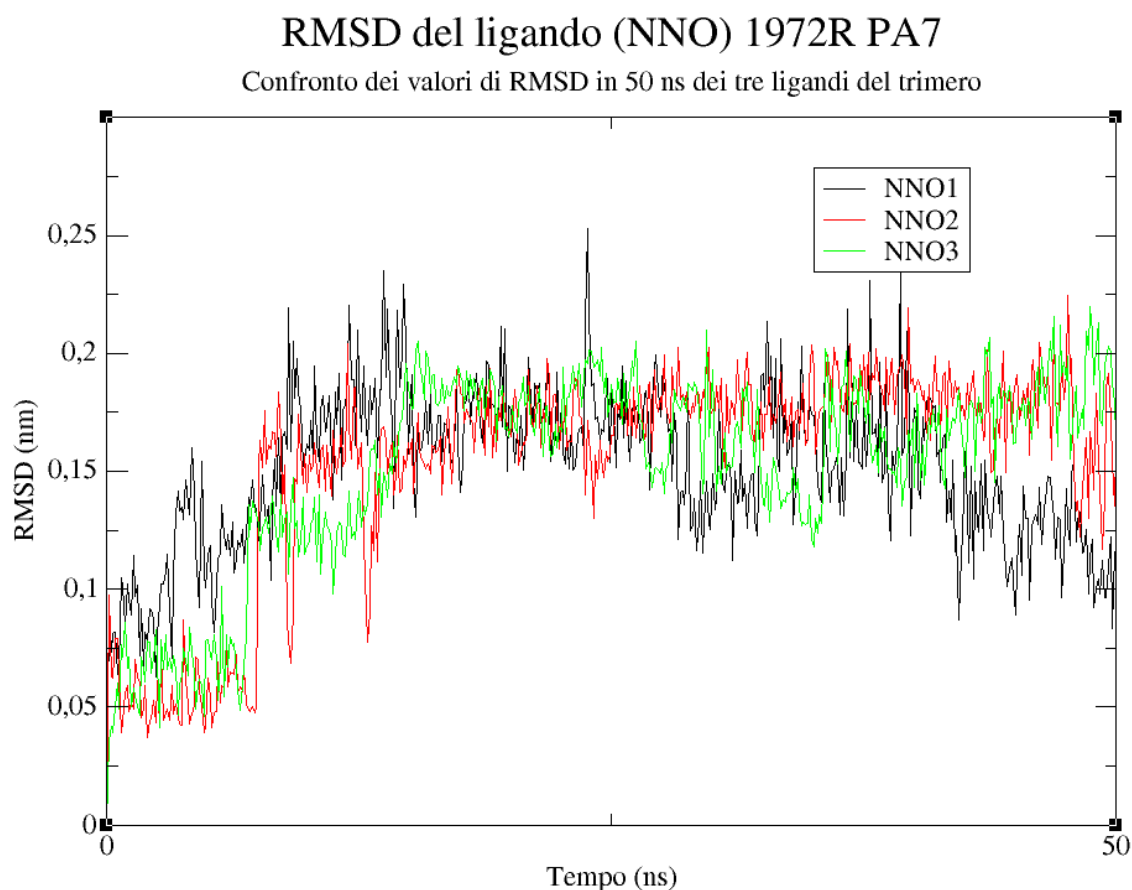


Le tasche di legame si comportano in maniera molto simile alla dinamica eseguita su PA7 in cui c'è un lento aumento di valore di RMSD, ALP3 è quello che si mantiene intorno a valori più bassi.

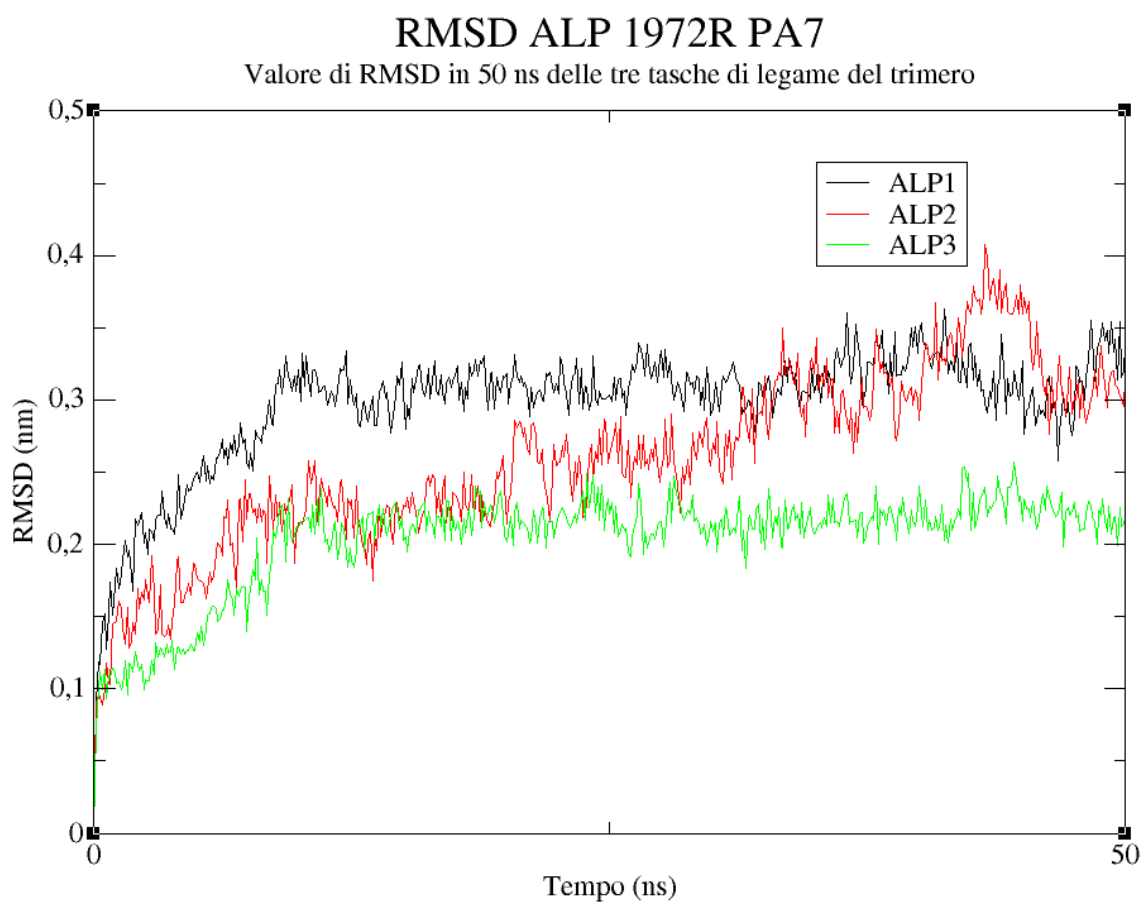
7.2.1 Dinamica di 1972 R su PA7



Con il ligando 1972 R la stabilità dell'intero sistema e della proteina non cambiano, sono stabili al pari dei sistemi contenenti il ligando 1994 in entrambe le sue forme enantiomeriche.

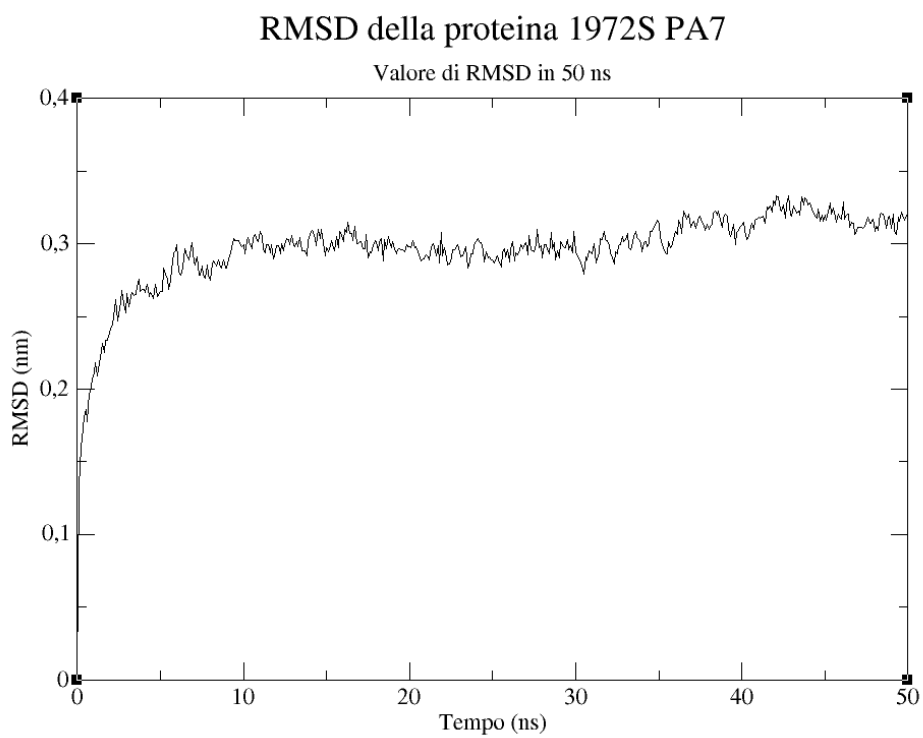
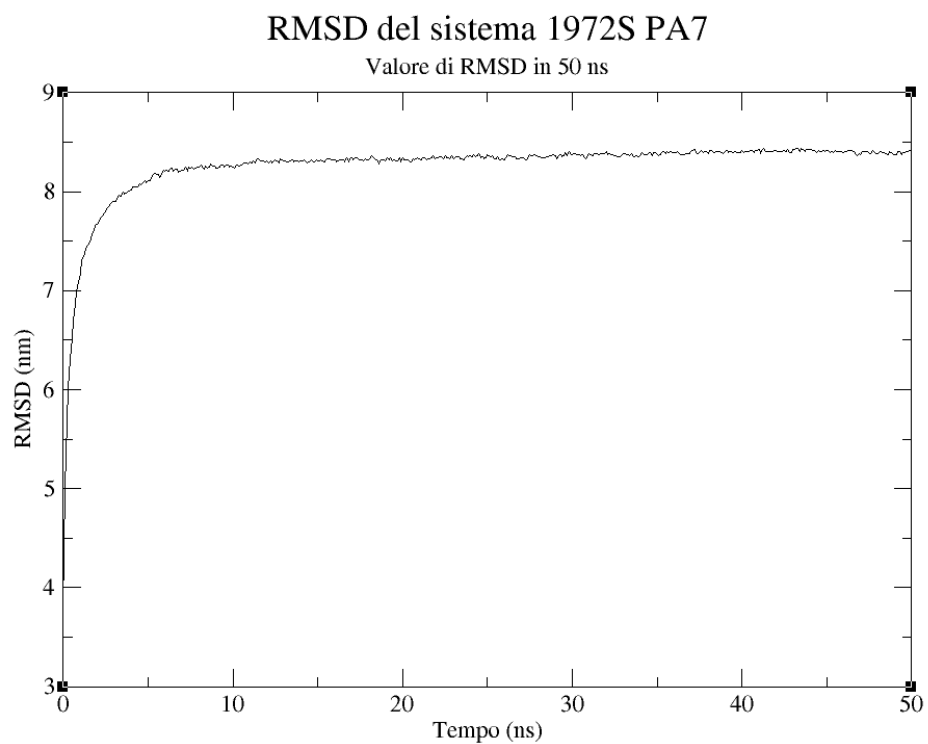


Analizzando i valori di RMSD dei tre ligandi, si nota subito un innalzamento del valore di circa 0,1 nm nei primi 15 ns: questo innalzamento è graduale per il ligando NNO1 mentre è repentino per NNO2 ed NNO3, successivamente si può notare anche come NNO1 è sommariamente più stabile rispetto agli altri 2.

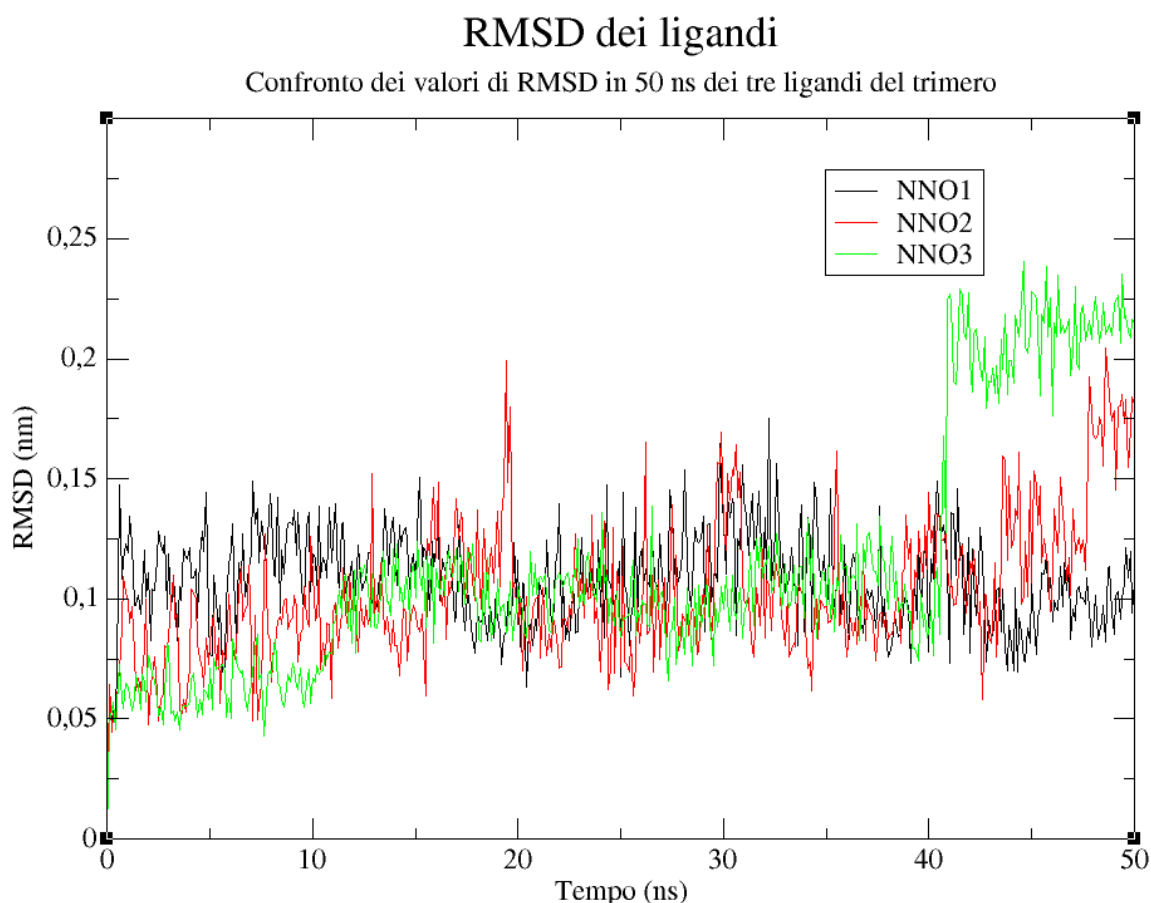


I valori concernenti le 3 tasche di legame sono abbastanza distinti, un'unica sovrapposizione è presente verso 40 ns tra ALP1 e ALP2. ALP3 si presenta come la tasca più stabile a causa dei minori valori di RMSD.

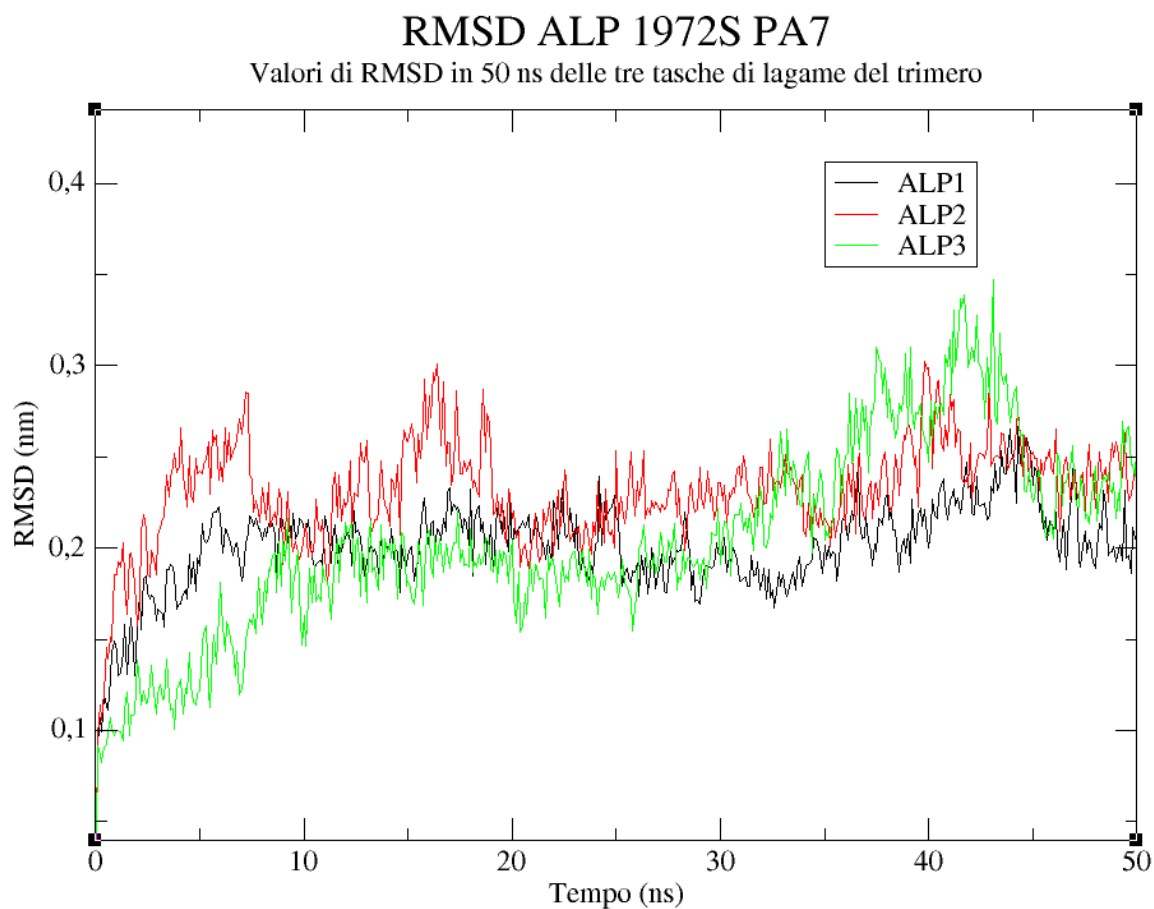
7.2.2 Dinamica di 1972 S su PA7



Il comportamento di sistema e proteina è molto simile nei due enantiomeri, la proteina con 1972S è leggermente più stabile.



I valori di RMSD ottenuti dai tre ligandi sono molto simili tra loro fino al raggiungimento dei 40 ns, dove NNO3 ha un picco di innalzamento fino a circa 0,22 nm per poi restare stabile intorno al medesimo valore. Dall'analisi di NNO1 ed NNO2 si notano evidenti picchi in NNO2 decretando NNO1 come ligando più stabile.



Dall'analisi dei valori di RMSD delle tre tasche di legame si evince che ALP2 ed ALP3 hanno più fluttuazioni nei valori riportati risultando quindi leggermente meno stabili di ALP1.

7.3 Energia di interazione Short Range (SR)

Di seguito sono riportate le energie di interazione *short range* (SR), cioè interazioni forti e deboli, nello specifico Coulombiane e di Lennard-Jones (LJ) calcolate attraverso GROMACS. Le Coulombiane misurano il contributo dato dalle interazioni degli amminoacidi polari/idrofilici, mentre le LJ misurano il contributo energetico degli amminoacidi apolari/idrofobici. Le energie sono state calcolate tenendo conto di tutti i 50 ns ottenuti dalle precedenti simulazioni.

1994R PA7	Energy Average (kJ/mol)	RMSD (nm)	Total Drift (kJ/mol)
Coul-SR	-183.195 +/- 8.8	43.0368	-30.8368
LJ-SR	-640.089 +/- 25	56.5103	175.762

1994S PA7	Energy Average (kJ/mol)	RMSD (nm)	Total Drift (kJ/mol)
Coul-SR	-396.171 +/- 9.6	54.3941	-54.2943
LJ-SR	-498.521 +/- 18	51.1978	69.8297

1994R NC04	Energy Average (kJ/mol)	RMSD (nm)	Total Drift (kJ/mol)
Coul-SR	-352.172 +/- 8.5	38.925	10.9738
LJ-SR	-658.754 +/- 6.7	28.9629	-21.5326

1994S NC04	Energy Average (kJ/mol)	RMSD (nm)	Total Drift (kJ/mol)
Coul-SR	-171.133 +/- 7.5	33.1416	42.1028
LJ-SR	-458.79 +/- 15	46.3278	96.9626

1972R PA7	Energy Average (kJ/mol)	RMSD (nm)	Total Drift (kJ/mol)
Coul-SR	-271.17 +/- 5.1	35.2848	-15.8738
LJ-SR	-646.63 +/- 14	40.4298	78.0232

1972S PA7	Energy Average (kJ/mol)	RMSD (nm)	Total Drift (kJ/mol)
Coul-SR	-252.34 +/- 24	61.0928	114.298
LJ-SR	-654.746 +/- 13	36.4855	75.8796

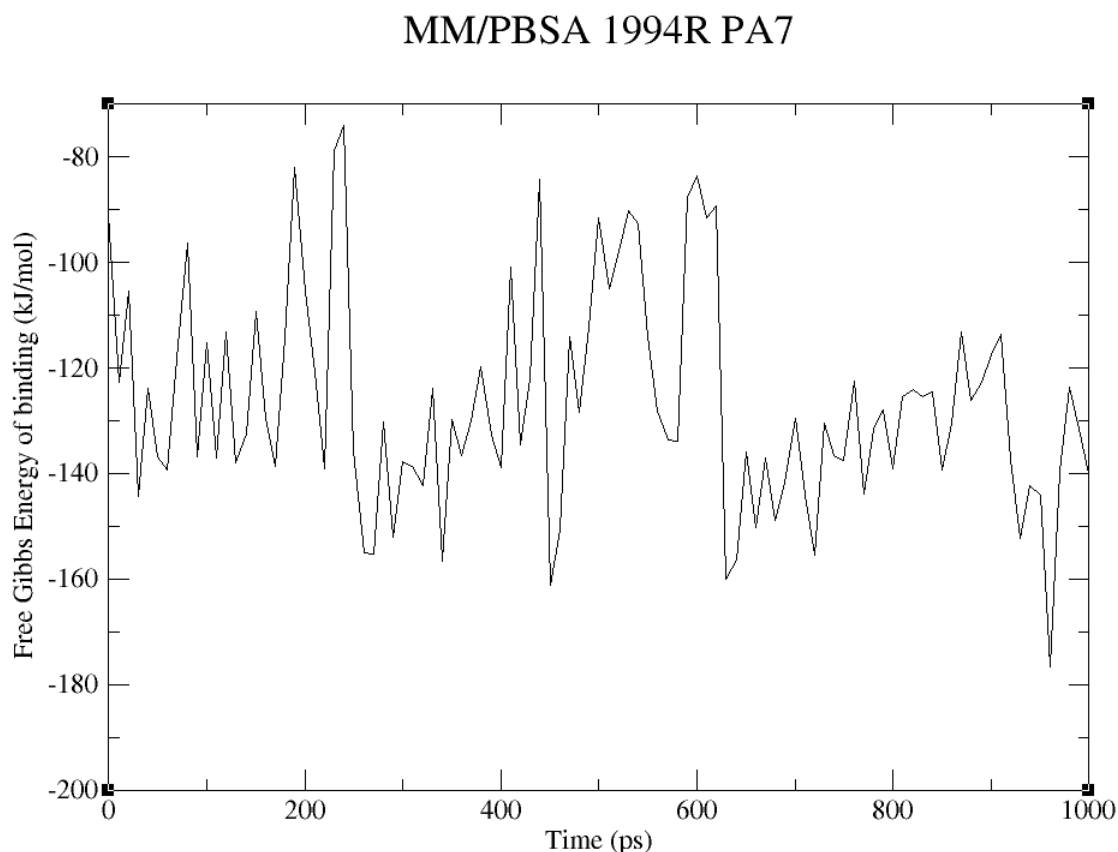
Dalle analisi si evince che i composti sono tutti attivi, nello specifico, analizzando e confrontando gli enantiomeri R ed S del composto 1994 si nota che le Coulombiane sono migliori in S quando interagisce con PA7 mentre sono migliori in R quando l'interazione è con NC04. Questo potrebbe essere spiegato dalla diversa interazione dei due enantiomeri con gli amminoacidi del sito allosterico dei due ceppi e anche dalle posizioni che i ligandi occupano all'interno di esso. Le LJ invece seguono lo stesso pattern in tutti e due i ceppi batterici. Per quanto riguarda il composto 1972 sono stati ottenuti risultati simili, quasi sovrapponibili, in entrambi i ceppi. Questo composto, quindi, indipendentemente dall'enantiomero agisce quasi alla stessa maniera.

7.4 Risultati di g_mmpbsa

Attraverso g_mmpbsa sono stati calcolati 16 termini differenti in 1 ns di simulazione:

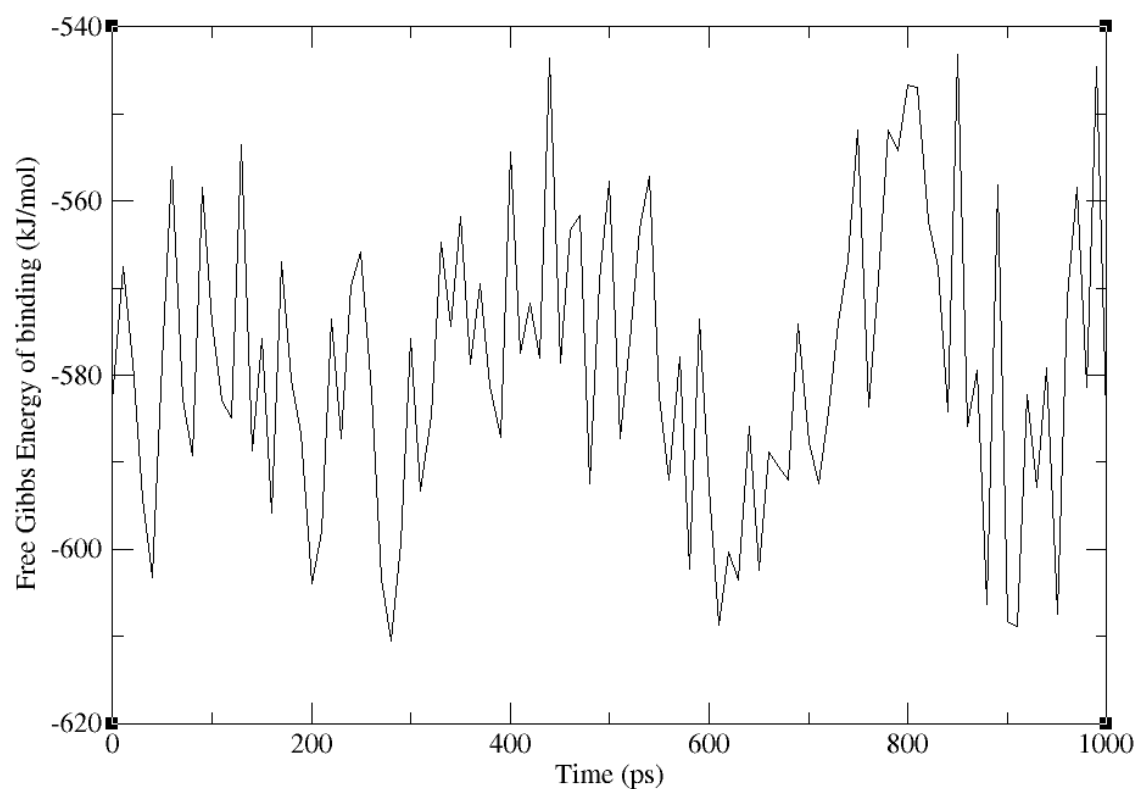
- Energia di Van der Waals (Proteina)
- Energia elettronica (Proteina)
- Energia Polare (Proteina)
- Energia Apolare (Proteina)
- Energia di Van der Waals (Ligando)
- Energia elettronica (Ligando)
- Energia Polare (Ligando)
- Energia Apolare (Ligando)
- Energia di Van der Waals (Complesso)
- Energia elettronica (Complesso)
- Energia Polare (Complesso)
- Energia Apolare (Complesso)
- ΔE_{MM}
- ΔE Polare
- ΔE Apolare
- ΔE Binding

Questi termini sono stati plottati per ogni composto e ceppo fino ad ottenere un unico termine energetico espresso in Energia libera di Gibbs (kJ/mol).



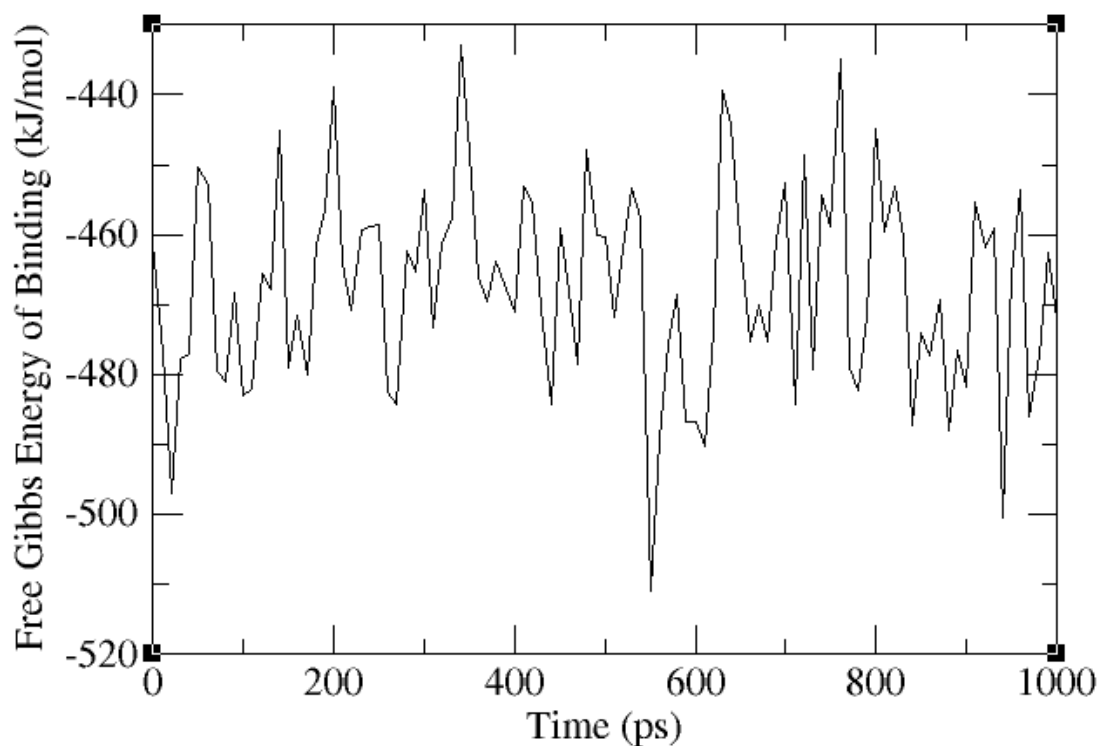
L'energia libera ottenuta dal composto 1994R con PA7 è di -126.540 ± 20.553 kJ/mol, è un'energia molto più alta rispetto a quello che ci si aspettava, visti anche i risultati ottenuti dalle energie di interazione short range. Questo valore presumibilmente è dovuto ad un ingombro sterico tra la proteina e il posizionamento del ligando, sarà quindi cruciale visionare con attenzione la posizione del ligando all'interno del sito di legame confrontando anche la sua posizione prima e post dinamica molecolare.

MM/PBSA 1994S PA7



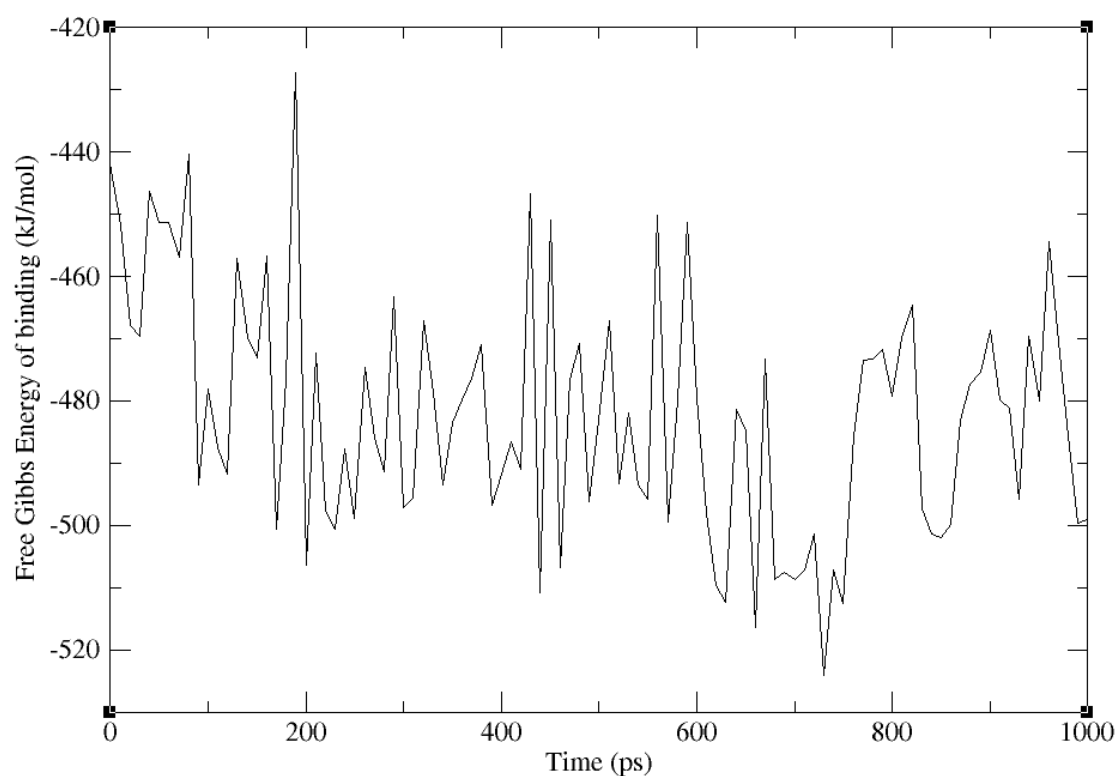
L'energia ottenuta dal composto 1994S con PA7 è nettamente migliore di quella del suo corrispondente enantiomero e corrisponde a -578.832 ± 16.557 kJ/mol, ed è collegata ad un miglior posizionamento del ligando rispetto al suo stereoisomero che massimizza l'efficacia delle interazioni non-bonding con altri amminoacidi del sito ALP.

MM/PBSA 1994R NC04



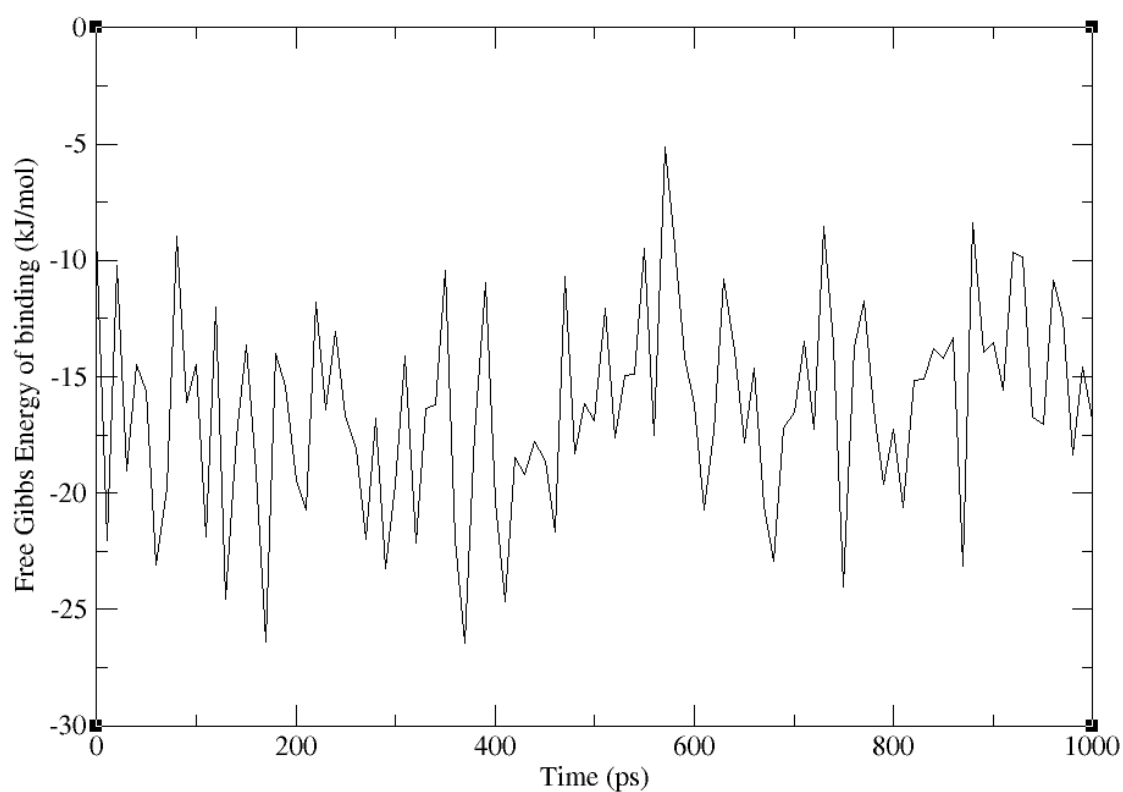
Il risultato ottenuto da 1994R con il ceppo clinico NC04 è nettamente differente rispetto a quella dello stesso composto con PA07, l'energia libera è di -467.832 ± 14.337 kJ/mol. Il ligando nella sua posa di binding sviluppa un minor ingombro sterico ed interagisce con molti amminoacidi del sito di legame. le discrepanze energetiche ottenute tra i due ceppi possono essere razionalizzate solo attraverso la visualizzazione grafica.

MM/PBSA 1994S NC04



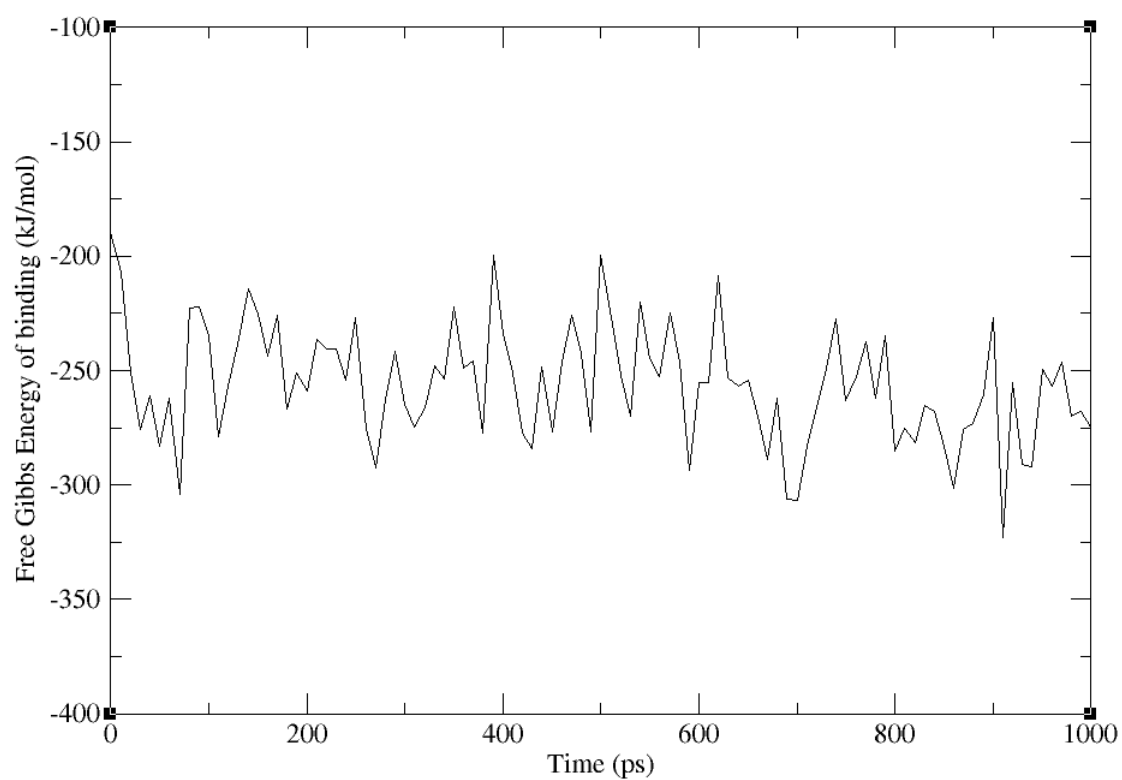
I risultati ottenuti dal composto 1994S nel ceppo clinico sono in linea con quelli ottenuti con PA7. L'energia libera registrata è di -482.190 ± 19.33 kJ/mol, leggermente minore rispetto al ceppo di controllo con un trend identico a quello visto nei risultati ottenuti dal calcolo dell'energia di interazione.

MM/PBSA 1972R PA7



I risultati ottenuti dal composto 1972R con PA7 non sono soddisfacenti. L'energia libera è di soli -16.305 ± 4.35 kJ/mol. Il dato non è in linea perché le interazioni short range avevano dato valori corrispondenti a -271 kJ/mol (valore approssimato) per le Coulombiane e -647 kJ/mol (valore approssimato) per le LJ. È necessario analizzare il ligando in modo da identificare eventuali ingombri sterici o scarse interazioni con amminoacidi.

MM/PBSA 1972S PA7



L'enantiomero S del composto 1972 ha dato ottimi risultati con PA7 con un'energia libera di -255.958 ± 25.289 kJ/mol. Anche questi valori sono in linea con ciò che è stato ottenuto dalle precedenti analisi energetiche short range.

7.5 Sovrapposizione pre- e post-dinamica

Di seguito verranno inserite rappresentazioni grafiche ottenute con Chimera ver. 1.16; nello specifico sono rappresentate le pose di ogni ligando prima e post dinamica: il magenta rappresenta sempre la posa pre-dinamica mentre il colore verde rappresenta un enantiomero R post dinamica e il colore rosso rappresenta un enantiomero S post-dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.

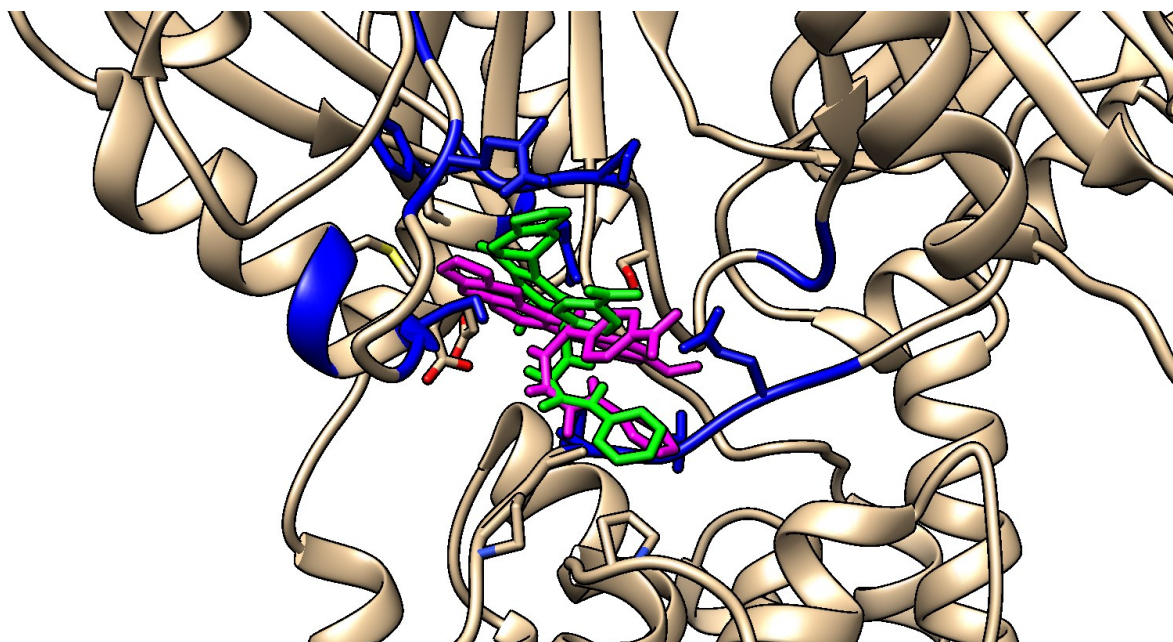


Figura 11. Pose pre- e post-dinamica del composto 1994R con PA7: il magenta rappresenta sempre la posa pre-dinamica mentre il colore verde rappresenta post dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.

Il primo composto sovrapposto è stato 1994R con PA7, la posa è leggermente cambiata; infatti, si può notare il ligando ruotato di circa 90° rispetto alla posa pre-dinamica derivante dal docking molecolare.

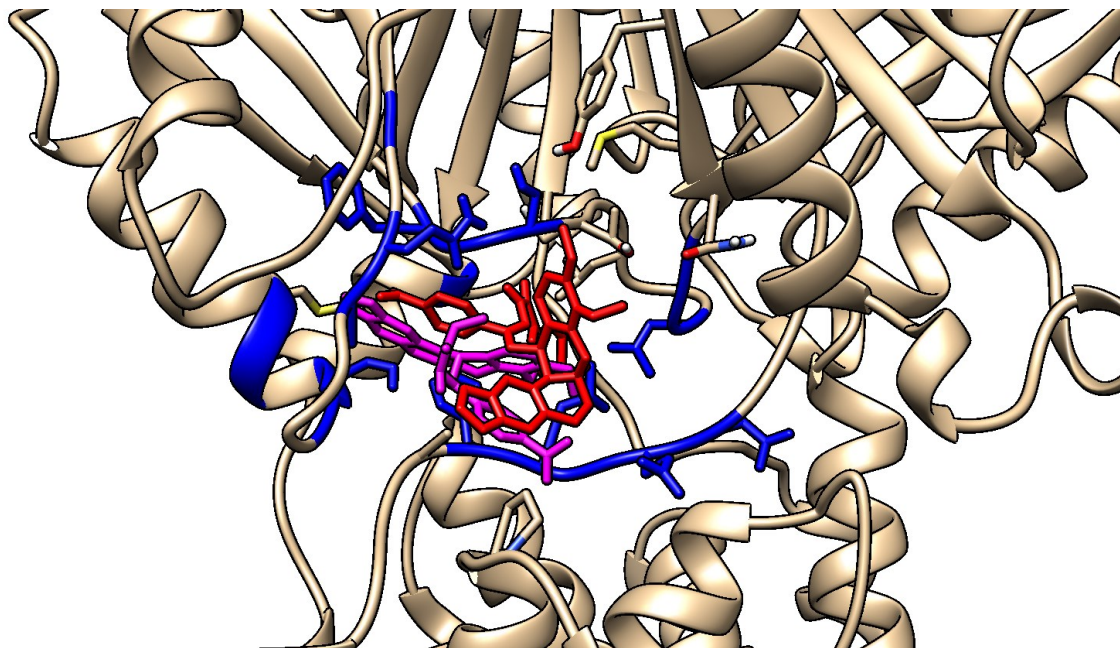


Figura 12. Pose pre- e post-dinamica del composto 1994S con PA7: il magenta rappresenta sempre la posa pre-dinamica mentre il colore rosso rappresenta post dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.

Il suo enantiomero corrispondente S si è comportato in maniera molto simile, post-dinamica la posa è più centrale.

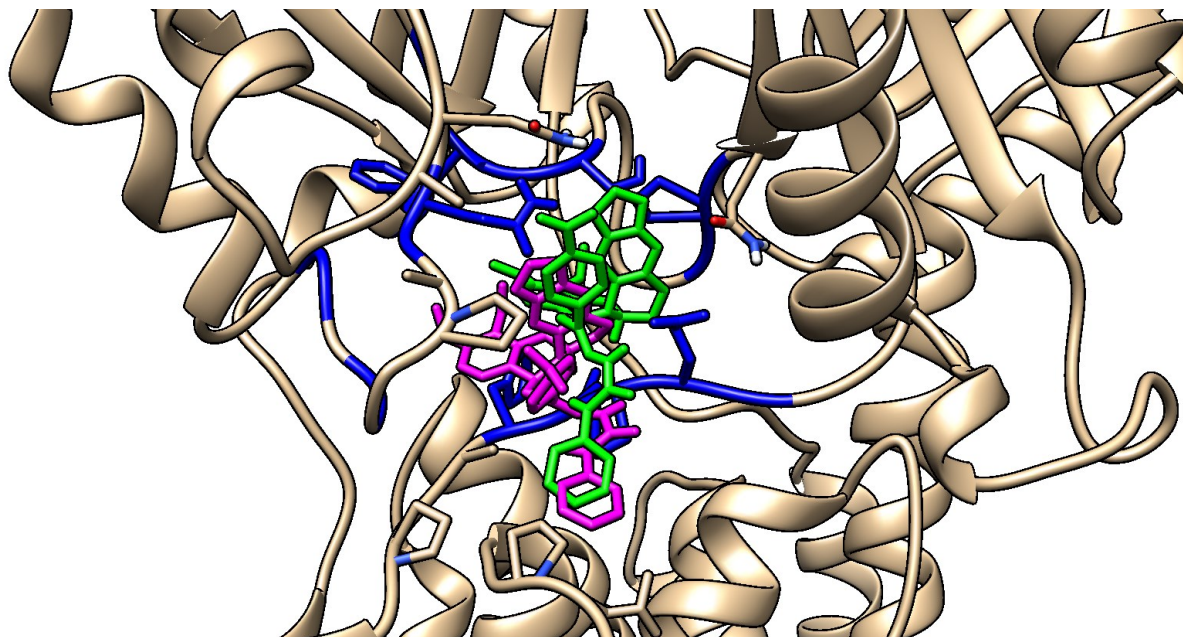


Figura 13. *Pose pre- e post-dinamica del composto 1994R con NC04: il magenta rappresenta sempre la posa pre-dinamica mentre il colore verde rappresenta post dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.*

Il composto 1994R all'interno del ceppo clinico NC04 ha mantenuto quasi la stessa posizione che aveva assunto pre-dinamica. Probabilmente le posizioni sfalsate sono principalmente dovute al normale movimento molecolare dell'intero complesso avvenuto nel corso dei 50 ns di simulazione.

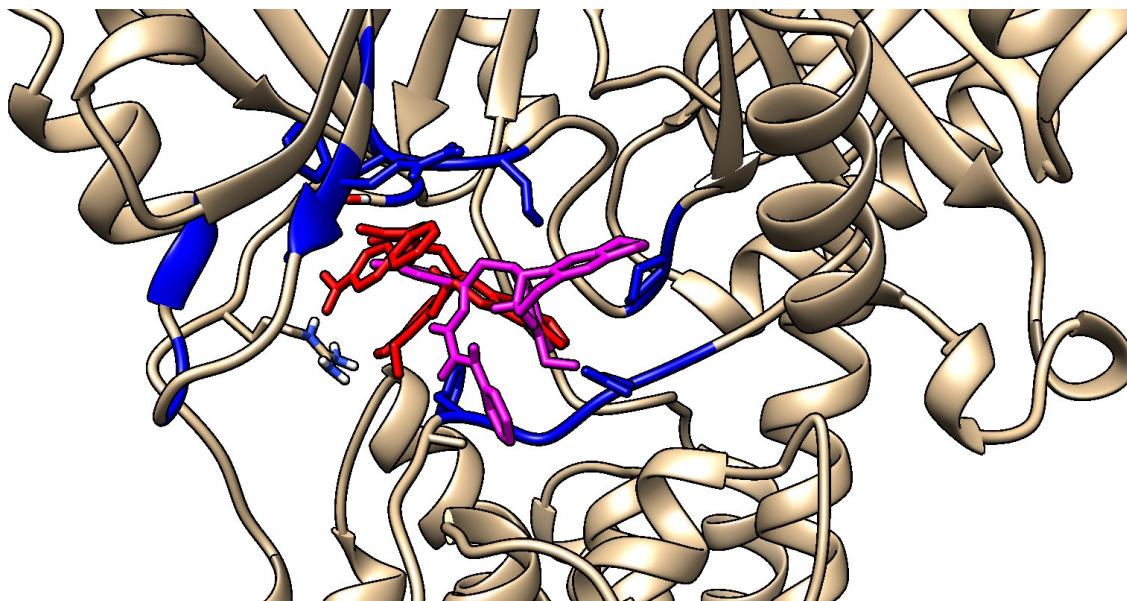


Figura 14. *Pose pre- e post-dinamica del composto 1994S con NC04*

1994S ha leggermente cambiato la sua posa subendo una leggera rotazione, come detto precedentemente, la diversa posizione può essere dovuta alla normale oscillazione del complesso.

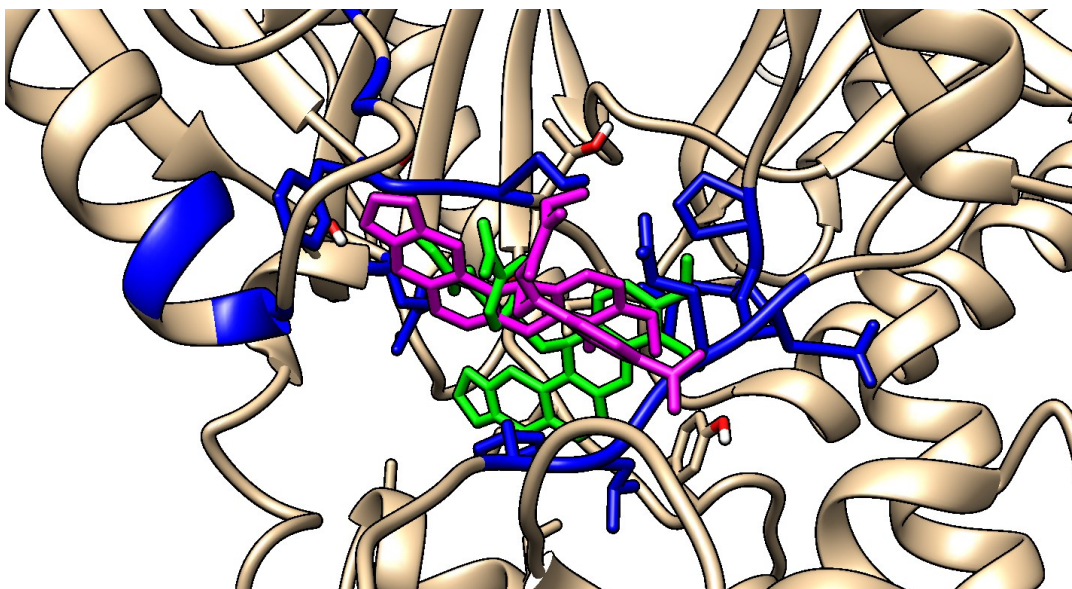


Figura 15. *Pose pre- e post-dinamica del composto 1972R con PA7*

Il composto 1972R presenta un radicale cambio di posizione, infatti lo si vede spostato molto in basso al confine con la parte inferiore del sito allosterico. Da questa nuova si riconduce al bassissimo valore di energia libera di Gibbs scovato attraverso le analisi di g_mmpbsa: la sua posa sfavorevole causa ingombro sterico con dei loop proteici che vanno a chiudersi a ridosso della parte aromatica del composto.

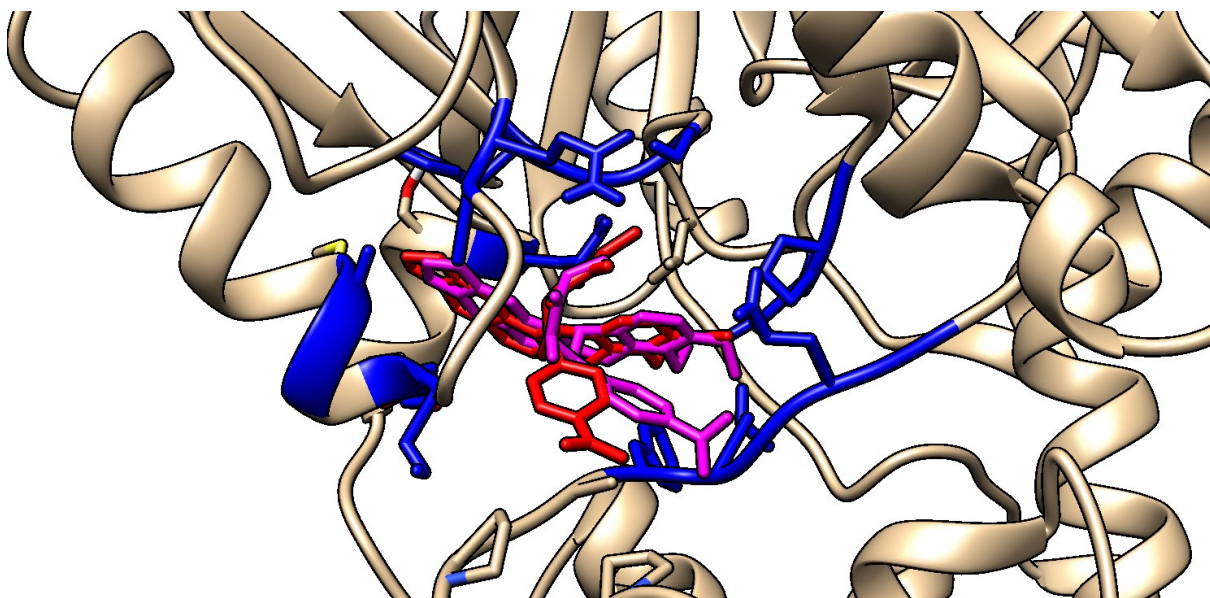


Figura 16. *Pose pre- e post-dinamica del composto 1972S con PA7*

L'enantiomero S ha solo leggermente ruotato la sua posa, ma ha mantenuto la stessa posizione nello spazio.

Da tutte queste analisi effettuate sono giunto alla conclusione che è necessario effettuare le seguenti sovrapposizioni al fine di discernere quale dei composti sia il migliore: sovrapposizione di 1994R ed S con PA7, sovrapposizione di 1994R

ed S con NC04, sovrapposizione di 1972R ed S con PA7 e sovrapposizione di 1994R e 1972 R per capire come mai le energie libere ottenute con g_mmpbsa sono così basse ed analizzare eventuali ingombri sterici. Inoltre, è opportuno capire quali interazioni comuni sono presenti con gli amminoacidi del sito di legame.

7.6 Sovrapposizioni e confronti post-dinamica tra i vari enantiomeri

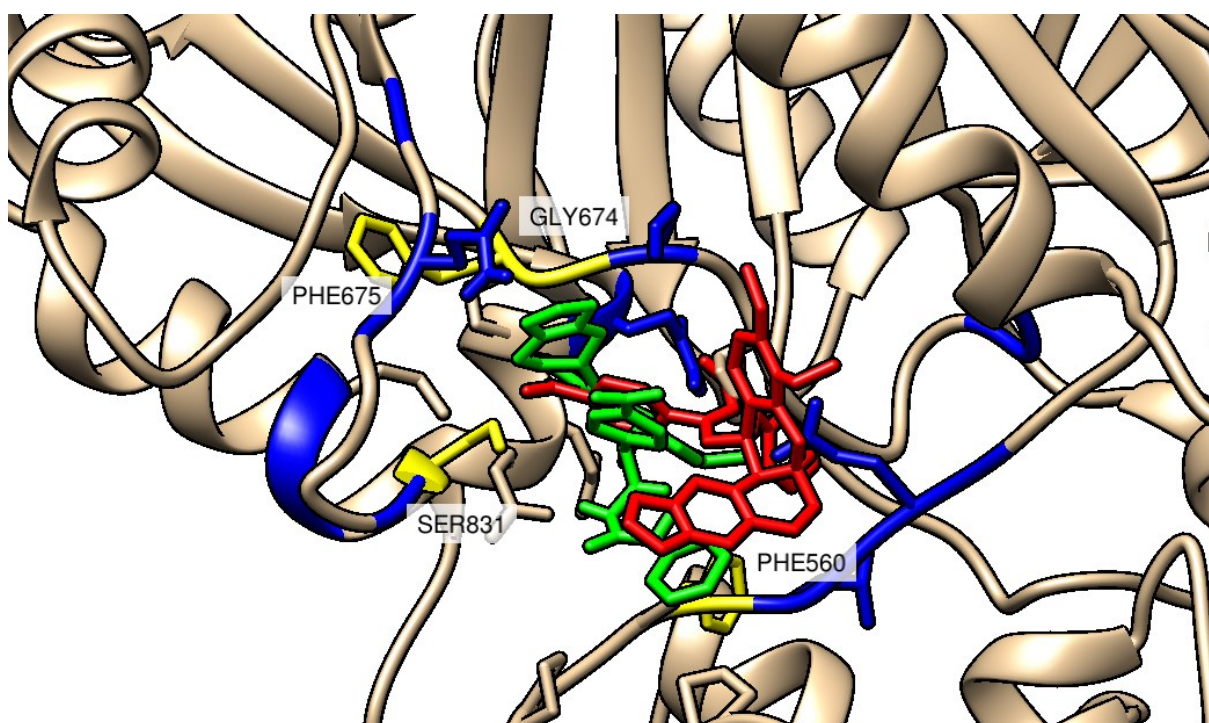


Figura 17. Sovrapposizione di 1994 R ed S con PA7: il colore verde rappresenta l'enantiomero R, il rosso l'enantiomero S, post dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.

Dai precedenti calcoli di g_{mmpbsa} l'enantiomero S si è dimostrato nettamente superiore rispetto al suo corrispondente (circa -578 kJ/mol rispetto a circa -126 kJ/mol) (la previsione del docking è in linea con questo dato) . Dalla sovrapposizione si può notare che la sua posizione spostata leggermente a destra nel sito allosterico fa sì che riesca probabilmente ad evitare di generare ingombro sterico con altri amminoacidi non facenti parte della tasca di legame, cosa che R non fa trovandosi spostato più internamente alla tasca di legame, probabilmente proprio a causa di un ingombro sterico ha alti valori di energia libera di Gibbs. In giallo sono indicati gli amminoacidi della tasca con cui entrambi i composti interagiscono e sono PHE675, GLY674, PHE560 e SER831.

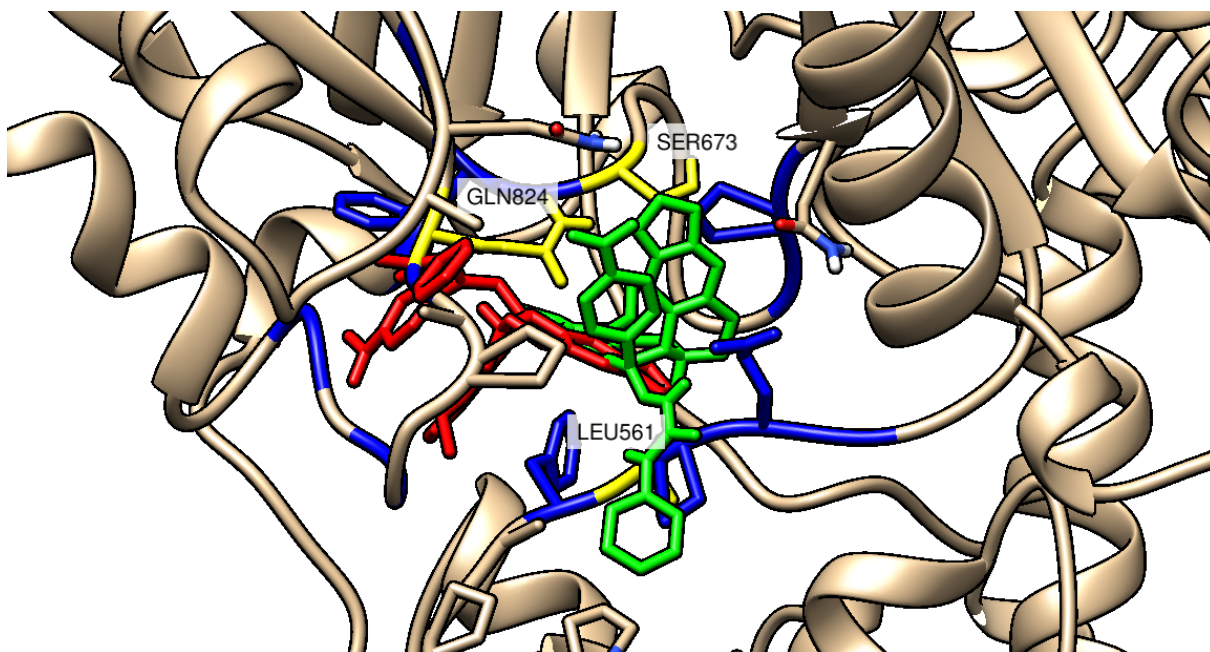


Figura 18. Sovrapposizione di 1994 R ed S con NC04: il colore verde rappresenta l'enantiomero R, il rosso l'enantiomero S, post dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.

All'interno del ceppo clinico NC04 il comportamento e la posa delle molecole sono completamente diversi: entrambi possiedono ottimi valori di energia libera di Gibbs, dovuti ad una eccellente distribuzione di entrambi i composti all'interno della tasca di legame. L'enantiomero R è leggermente meno efficace dell'S probabilmente a causa di un anello aromatico che esce dalla tasca di legame verso il basso. L'enantiomero S si distribuisce perfettamente con i 3 anelli aromatici

privi di ingombri sterici. Gli amminoacidi con cui entrambi interagiscono sono GLN824, SER673, LEU561.

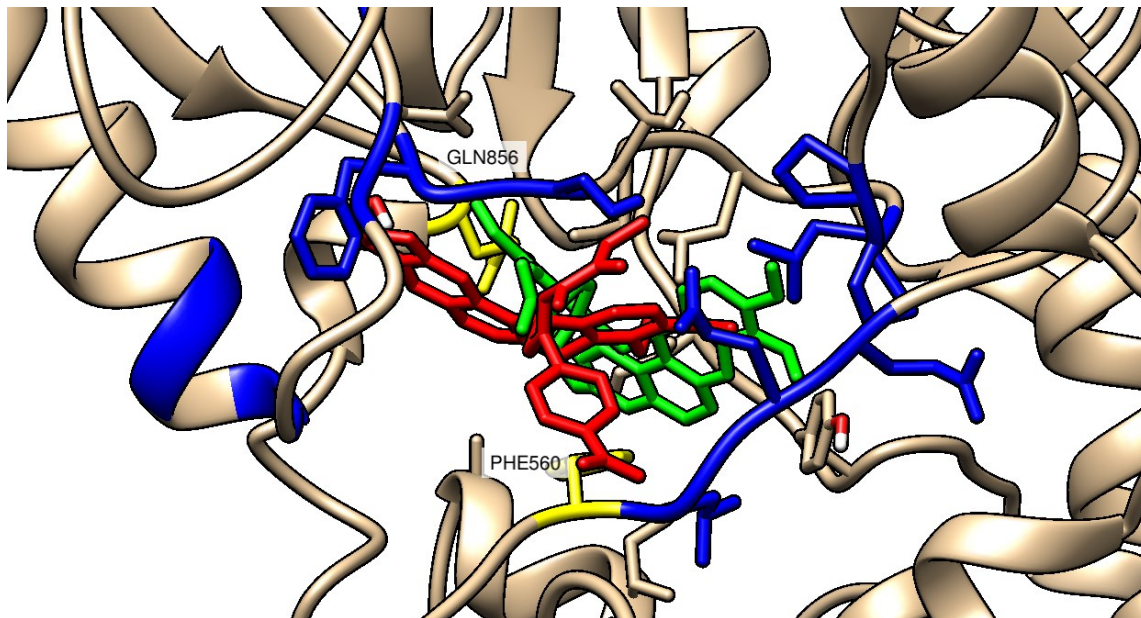


Figura 19. Sovrapposizione di 1972 R ed S con PA7

Questa sovrapposizione è necessaria a chiarire il perché l'enantiomero S del composto 1972 ha attività molto più elevata rispetto al suo corrispettivo R. Si può evincere che S, colorato in rosso, abbia una posizione nettamente più favorevole, è più centrato e riesce ad avere molte più interazioni con gli amminoacidi della tasca di legame. È opportuno specificare che l'energia libera ottenuta dal calcolo di g_mmpbsa è comunque di valori numericamente maggiori rispetto a quella ottenuta da 1994, infatti si assesta intorno ai -256 kJ/mol e di conseguenza ha minore capacità di inerazione. L'enantiomero R invece ha energia libera quasi pari a 0 ed è un composto praticamente inutile ai fini del mio studio: si nota come tutto

il corpo principale della molecola protrude verso l'interno della proteina, è molto più interno rispetto all'S ed esce quasi completamente dal sito di interazione.

Interazioni comuni con amminoacidi: GLN856, LEU669, PHE560.

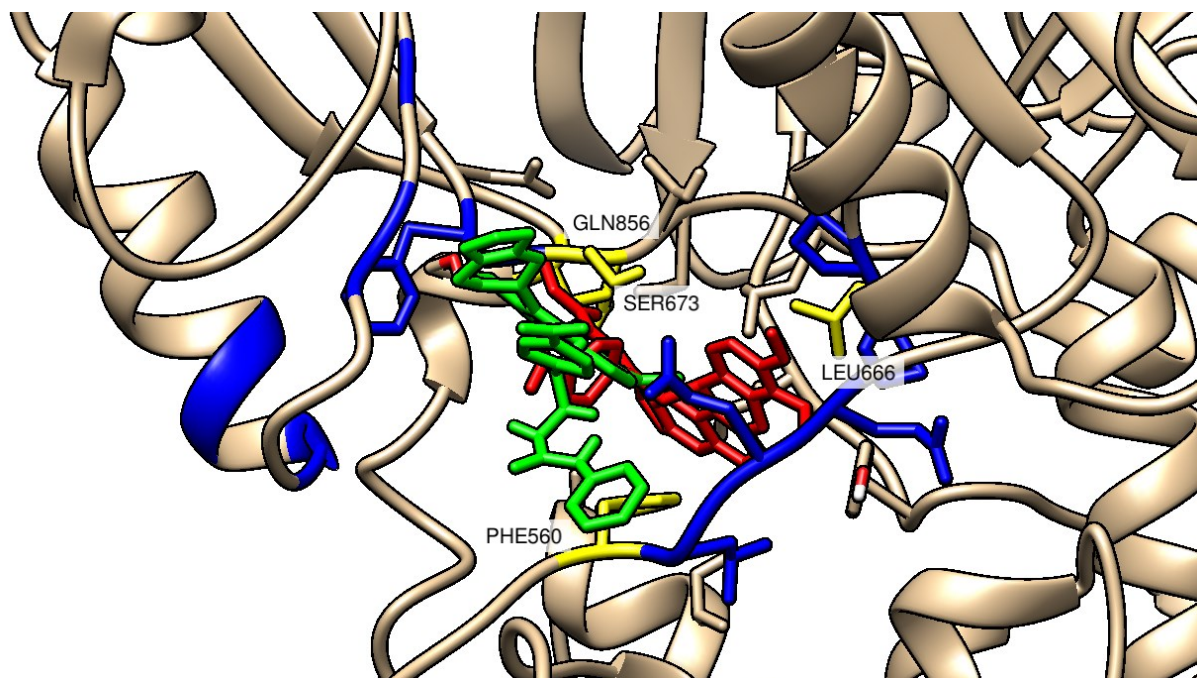


Figura 20. Sovrapposizione di 1972R e 1994R con PA7: il colore verde rappresenta l'enantiomero R, il rosso l'enantiomero S, post dinamica. Le parti di proteina colorate in blu rappresentano gli amminoacidi che compongono il sito allosterico.

Questa sovrapposizione è necessaria solo per comprendere come anche composti con bassa affinità per il sito allosterico vadano ad interagire con alcuni amminoacidi ritrovati anche nelle altre sovrapposizioni; questi due composti

hanno in comune GLN856, SER673, LEU666, PHE560. In particolare, GLN856, un amminoacido polare e PHE560, un amminoacido apolare.

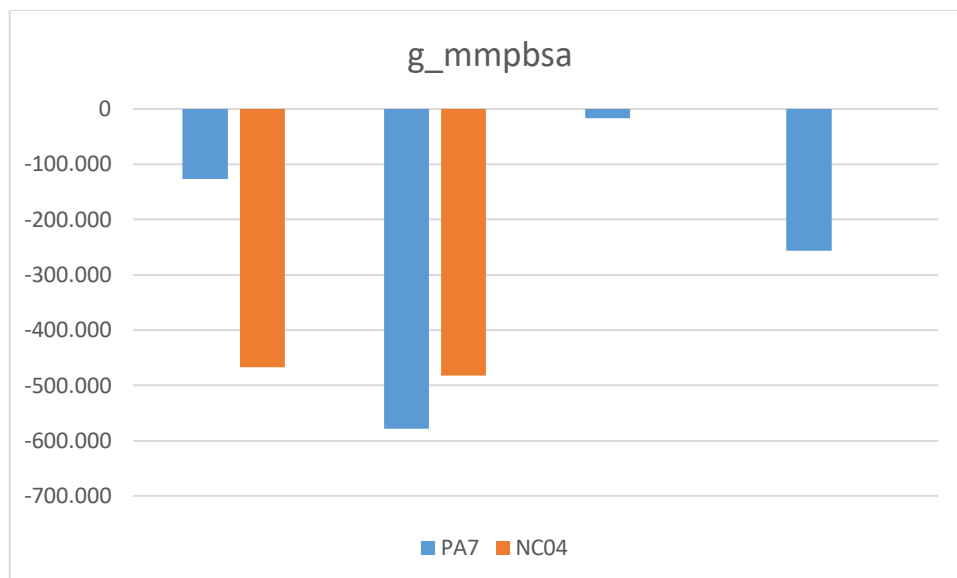


Figura 21. *Grafico a barre che riporta il resoconto dei valori di energia libera di Gibbs (kJ/mol) ottenuti dai calcoli di g_mmpbsa.*

7.7 Risultati ottenuti dalle prove microbiologiche in vitro

Le prove microbiologiche sono state condotte esclusivamente sulla miscela racemica del composto 1994, analogo alla DHBER. Sono stati effettuati dei *checkerboard assays* al fine di valutare le MIC della Tobramicina in corrispondenza di una determinata concentrazione di composto ($\mu\text{g/ml}$). Di seguito verranno riportate le analisi su PA7 ed il ceppo clinico NC04.

PA7	
2F ($\mu\text{g/ml}$)	Tobra ($\mu\text{g/ml}$)
>320	C+
320	64
160	32
80	32
40	32
20	32
10	32
DMSO	128
0	128

NC04	
2F ($\mu\text{g/ml}$)	Tobra ($\mu\text{g/ml}$)
>320	C+
320	4
160	8
80	8
40	8
20	8
10	8
DMSO	16
0	16

Dai risultati ottenuti si nota come la MIC all'interno del ceppo clinico NC04 diminuisce di 8 volte rispetto a PA7 a concentrazioni di composto pari a 320 $\mu\text{g/ml}$ mentre diminuisce di 4 volte a concentrazioni a partire da 160 $\mu\text{g/ml}$ fino a 10 $\mu\text{g/ml}$. Alla luce di ciò, il composto 1994 seppur testato solo sottoforma di miscela racemica si è rivelato essere efficace nella lotta all'antibiotico resistenza nonostante non riesca ancora a ripristinare la suscettibilità.

Capitolo ottavo

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

In seguito ai dati ottenuti *in silico*, i composti analoghi della Berberina 1994 in entrambe le sue forme enantiomeriche R ed S e 1972R ed S ricavati da metodiche computazionali come il *Virtual Screening* hanno confermato la loro interazione con il sito allosterico situato all'interno della pompa di efflusso MexXY-OprM di *P.aeruginosa*. Nello specifico, attraverso metodiche di Docking molecolare, l'interazione, per alcuni enantiomeri, è molto forte all'interno del ceppo di controllo PA7 e nel ceppo clinico NC04 e pertanto sono stati scelti per ulteriori analisi e approfondimenti in silico. Interazioni sono state anche individuate all'interno dei ceppi clinici AR48, AR86 e C15 seppur di minore rilevanza rispetto a NC04. Infine, attraverso simulazioni di dinamica molecolare, calcoli di energia di interazione *short range* ed uso di g_mmpbsa al fine di individuare interazioni polari e apolari è emerso che l'enantiomero S del composto 1994 è il più indicato per ricoprire il ruolo di inibitore di pompa di efflusso grazie ad eccellenti risultati in termini energetici ottenuti sia sul ceppo PA7, sia sul ceppo clinico NC04. I composti 1994 R e 1972 R hanno ottenuto scarsi risultati ed interagiscono molto meno rispetto ai loro corrispettivi enantiomeri S, ad eccezione del composto 1994 R che ha ottenuto buoni risultati sul ceppo clinico anche se di minore rilevanza rispetto all'enantiomero S. Il composto 1972 S, seppur testato solo sul ceppo PA7,

ha ottenuto buoni risultati in termini energetici ma comunque non paragonabili a 1994 S. Infine, dalle prove microbiologiche *in vitro*, condotte solo sul composto 1994 in forma racemica è stata ottenuta una notevole riduzione della MIC sul ceppo NC04 rispetto a PA7 con valori minori anche di 8 volte rispetto alle stesse concentrazioni di composto somministrate al ceppo PA7.

Bisogna comunque notare che il risultato del test microbiologico *in vitro* è un effetto mediato dei due enantiomeri. Pertanto, è ragionevole supporre che se fosse possibile ottenere i due enantiomeri in forma pura, i valori di MIC diminuirebbero sensibilmente utilizzando per ciascun ceppo l'enantiomero più attivo.

Inoltre, i risultati di questo lavoro di tesi mettono in luce e confermano quanto sia importante considerare la stereochimica di potenziali inibitori, essendo l'interazione di binding il risultato di interazioni 3D in ambienti chirali (proteina, ligando).

In conclusione, il composto 1994 S, analogo della Berberina, dalle analisi di chimica computazionale è emerso come un ottimo candidato per l'inibizione della pompa di efflusso MexXY-OprM sia sulle forme canoniche che in quelle mutate, e pone le basi per ulteriori approfondimenti per lo studio di analoghi della Berberina nella lotta all'antibiotico resistenza e per la costruzione di una mappa 3D farmacoforica per un modello di interazione. Non si può escludere che, una

terapia antibiotica mirata associata a tali composti, potrebbe migliorare la risposta terapeutica alle infezioni indotte da *P.aeruginosa*.

Bibliografia

1. Giorgini, G. *et al.* Inhibition of polymorphic MexXY-OprM efflux system in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates by Berberine derivatives. *ChemMedChem* **19**, e202300568 (2024).
2. Caliceti, C. *et al.* Novel role of the nutraceutical bioactive compound berberine in lectin-like OxLDL receptor 1-mediated endothelial dysfunction in comparison to lovastatin. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **27**, 552–563 (2017).
3. Tang, J. *et al.* Berberine and Coptidis Rhizoma as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. *Journal of Ethnopharmacology* **126**, 5–17 (2009).
4. Islam, Md. M. *et al.* Enhanced DNA Binding of 9- ω -Amino Alkyl Ether Analogs from the Plant Alkaloid Berberine. *DNA and Cell Biology* **30**, 123–133 (2011).
5. Mari, G. *et al.* Synthesis of new dihydroberberine and tetrahydroberberine analogues and evaluation of their antiproliferative activity on NCI-H1975 cells. *Beilstein J. Org. Chem.* **16**, 1606–1616 (2020).

6. Turner, N. *et al.* Berberine and Its More Biologically Available Derivative, Dihydroberberine, Inhibit Mitochondrial Respiratory Complex I. *Diabetes* **57**, 1414–1418 (2008).
7. Cheng, Z. *et al.* 8,8-Dimethyldihydroberberine with improved bioavailability and oral efficacy on obese and diabetic mouse models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18**, 5915–5924 (2010).
8. Chen, J. *et al.* Berberine derivatives reduce atherosclerotic plaque size and vulnerability in apoE^{−/−} mice. *J Transl Med* **12**, 326 (2014).
9. Herrendorff, R. *et al.* Identification of Plant-derived Alkaloids with Therapeutic Potential for Myotonic Dystrophy Type I. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 17165–17177 (2016).
10. Pietra, D., Borghini, A. & Bianucci, A. M. In vitro studies of antifibrotic and cytoprotective effects elicited by proto-berberine alkaloids in human dermal fibroblasts. *Pharmacological Reports* **67**, 1081–1089 (2015).
11. Zuo, G.-Y., Li, Y., Wang, G.-C., Li, Z.-S. & Han, J. Synergistic effects of berberines with antibiotics on clinical multi-drug resistant isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Med Chem Res* **23**, 2439–2444 (2014).

12. Zhou, Q. *et al.* Bioactive benzyloisoquinoline alkaloids from *Artabotrys hexapetalus*. *Phytochemistry Letters* **11**, 296–300 (2015).
13. Zhang, J. *et al.* A Review of the Traditional Uses, Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics, and Toxicology of *Corydalis yanhusuo*. *Natural Product Communications* **15**, 1934578X2095775 (2020).
14. Correché, E. R. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: Biological effects and structural aspects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 3641–3651 (2008).
15. Mari, G. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel heteroring-annulated pyrrolino-tetrahydroberberine analogues as antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **26**, 5037–5044 (2018).
16. Van Delden, C. <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no4/vandelden.htm>. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 551–560 (1998).
17. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E. & Guery, B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *DIC* **7**, 1–18 (2018).
18. Bouglé, A. *et al.* Comparison of 8 versus 15 days of antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized, controlled, open-label trial. *Intensive Care Med* **48**, 841–849 (2022).

19. Martínez Pérez-Crespo, P. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Community-Onset Bloodstream Infections: Characterization, Diagnostic Predictors, and Predictive Score Development—Results from the PRO-BAC Cohort. *Antibiotics* **11**, 707 (2022).
20. Hoshina, Y., Nakao, H., Yoshida, M., Kubota, M. & Ishiguro, A. Calcaneal osteomyelitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* without foot injury. *Pediatrics International* **63**, 601–602 (2021).
21. Tarafder, A. K. *et al.* Phage liquid crystalline droplets form occlusive sheaths that encapsulate and protect infectious rod-shaped bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 4724–4731 (2020).
22. Malhotra, S., Hayes, D. & Wozniak, D. J. Muroid *Pseudomonas aeruginosa* and regional inflammation in the cystic fibrosis lung. *Journal of Cystic Fibrosis* **18**, 796–803 (2019).
23. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
24. Qin, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 199 (2022).

25. Park, W. S. *et al.* Benzyl Isothiocyanate Attenuates Inflammasome Activation in *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Stimulated THP-1 Cells and Exerts Regulation through the MAPKs/NF- κ B Pathway. *IJMS* **23**, 1228 (2022).
26. Sabnis, A. *et al.* Colistin kills bacteria by targeting lipopolysaccharide in the cytoplasmic membrane. *eLife* **10**, e65836 (2021).
27. Ozer, E. *et al.* An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. *Sci. Adv.* **7**, eabg8581 (2021).
28. Yang, J., Tsuei, K.-S. C. & Shen, E. The role of Type III secretion system in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* microbial keratitis. *Tzu Chi Med J* **34**, 8 (2022).
29. Karash, S., Nordell, R., Ozer, E. A. & Yahr, T. L. Genome Sequences of Two *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Defects in Type III Secretion System Gene Expression from a Chronic Ankle Wound Infection. *Microbiol Spectr* **9**, e00340-21 (2021).
30. Alatraktchi, F. A., Svendsen, W. E. & Molin, S. Electrochemical Detection of Pyocyanin as a Biomarker for *Pseudomonas aeruginosa*: A Focused Review. *Sensors (Basel)* **20**, 5218 (2020).

31. Chadha, J., Harjai, K. & Chhibber, S. Revisiting the virulence hallmarks of *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* : a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology* **24**, 2630–2656 (2022).
32. Perraud, Q. *et al.* Opportunistic use of catecholamine neurotransmitters as siderophores to access iron by *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* . *Environmental Microbiology* **24**, 878–893 (2022).
33. Dar, H. H. *et al.* A new thiol-independent mechanism of epithelial host defense against *Pseudomonas aeruginosa*: iNOS/NO• sabotage of theft-ferroptosis. *Redox Biology* **45**, 102045 (2021).
34. Skariyachan, S., Sridhar, V. S., Packirisamy, S., Kumargowda, S. T. & Challapilli, S. B. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol* **63**, 413–432 (2018).
35. McCready, A. R., Paczkowski, J. E., Cong, J.-P. & Bassler, B. L. An autoinducer-independent RhlR quorum-sensing receptor enables analysis of RhlR regulation. *PLoS Pathog* **15**, e1007820 (2019).
36. Sharma, S. *et al.* Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms* **11**, 1614 (2023).

37. Lomovskaya, O. *et al.* Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* : Novel Agents for Combination Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 105–116 (2001).
38. Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T. & Howell, P. L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbio.* **2**, (2011).
39. Sun, E. *et al.* Broad-Spectrum Adaptive Antibiotic Resistance Associated with *Pseudomonas aeruginosa* Mucin-Dependent Surfing Motility. *Antimicrob Agents Chemother* **62**, e00848-18 (2018).
40. Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y. & Hancock, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology* **191**, 121–130 (2014).
41. Breidenstein, E. B. M., De La Fuente-Núñez, C. & Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology* **19**, 419–426 (2011).
42. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* **37**, 177–192 (2019).

43. Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N. & Wretling, B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 710–712 (2000).
44. Kao, C.-Y. *et al.* Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiol* **16**, 107 (2016).
45. Dietz, H., Pfeifle, D. & Wiedemann, B. Location of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-glutamylmesodiaminopimelic acid, presumed signal molecule for beta-lactamase induction, in the bacterial cell. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2173–2177 (1996).
46. Hocquet, D. *et al.* MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1371–1375 (2003).
47. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56**, 20–51 (2005).

48. McMurry, L., Petrucci, R. E. & Levy, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3974–3977 (1980).
49. Ball, P. R., Shales, S. W. & Chopra, I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **93**, 74–81 (1980).
50. Piddock, L. J. V. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**, 382–402 (2006).
51. Ren, Q. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Research* **32**, 284D – 288 (2004).
52. Temgoua, F. T. D. & Wu, L. Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. *JBM* **07**, 48–70 (2019).
53. Stavri, M., Piddock, L. J. V. & Gibbons, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 1247–1260 (2007).
54. Li, X.-Z., Poole, K. & Nikaido, H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 27–33 (2003).

55. Aires, J. R., Köhler, T., Nikaido, H. & Plésiat, P. Involvement of an Active Efflux System in the Natural Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 2624–2628 (1999).
56. Sennhauser, G., Bukowska, M. A., Briand, C. & Grütter, M. G. Crystal Structure of the Multidrug Exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology* **389**, 134–145 (2009).
57. Laudadio, E. *et al.* Natural Alkaloid Berberine Activity against *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-Mediated Aminoglycoside Resistance: *In Silico* and *in Vitro* Studies. *J. Nat. Prod.* **82**, 1935–1944 (2019).
58. Giorgini, G. *et al.* Berberine Derivatives as *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-OprM Inhibitors: Activity and *In Silico* Insights. *Molecules* **26**, 6644 (2021).
59. Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S. & Martins, M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* **6**, 587 (2015).
60. Tsutsumi, K. *et al.* Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat Commun* **10**, 1520 (2019).
61. Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **3**, 408 (2012).

62. Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. & Yamaguchi, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**, 173–179 (2006).
63. Eicher, T. *et al.* Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 5687–5692 (2012).
64. Opperman, T. J. & Nguyen, S. T. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
65. Takatsuka, Y., Chen, C. & Nikaido, H. Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6559–6565 (2010).
66. Sharma, A., Gupta, V. K. & Pathania, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res* **149**, 129–145 (2019).
67. Nizi, M. G. *et al.* Discovery of 2-Phenylquinolines with Broad-Spectrum Anti-coronavirus Activity. *ACS Med Chem Lett* **13**, 855–864 (2022).
68. Plé, C. *et al.* Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat Commun* **13**, 115 (2022).

69. Aparna, V., Dineshkumar, K., Mohanalakshmi, N., Velmurugan, D. & Hopper, W. Identification of Natural Compound Inhibitors for Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Using In Silico High-Throughput Virtual Screening and In Vitro Validation. *PLoS ONE* **9**, e101840 (2014).
70. Li, X.-Z. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: *Drugs* **64**, 159–204 (2004).
71. Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V. & Pagès, J.-M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**, 1223–1229 (2007).
72. Sjuts, H. *et al.* Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 3509–3514 (2016).
73. docking molecolare - Treccani. *Treccani*
[https://www.treccani.it/enciclopedia/docking-molecolare_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/docking-molecolare_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)/), [https://www.treccani.it/enciclopedia/docking-molecolare_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/docking-molecolare_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)/).
74. https://autodock.scripps.edu/wp-content/uploads/sites/56/2022/04/AutoDock4.2.6_UserGuide.pdf.

[https://autodock.scripps.edu/wp-](https://autodock.scripps.edu/wp-content/uploads/sites/56/2022/04/AutoDock4.2.6_UserGuide.pdf)

[content/uploads/sites/56/2022/04/AutoDock4.2.6_UserGuide.pdf](https://autodock.scripps.edu/wp-content/uploads/sites/56/2022/04/AutoDock4.2.6_UserGuide.pdf).

75. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *CAD* **7**, 146–157 (2011).
76. Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1639–1662 (1998).
77. Lavecchia, A. & Giovanni, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. *CMC* **20**, 2839–2860 (2013).
78. Kumar, V., Krishna, S. & Siddiqi, M. I. Virtual screening strategies: Recent advances in the identification and design of anti-cancer agents. *Methods* **71**, 64–70 (2015).
79. Ehrlich, P. Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **42**, 17–47 (1909).
80. Smith, R. D. *et al.* CSAR Benchmark Exercise of 2010: Combined Evaluation Across All Submitted Scoring Functions. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2115–2131 (2011).

81. Lin, S.-K. Pharmacophore Perception, Development and Use in Drug Design. Edited by Osman F. Güner. *Molecules* **5**, 987–989 (2000).
82. Balasubramani, S. G. *et al.* TURBOMOLE: Modular program suite for *ab initio* quantum-chemical and condensed-matter simulations. *The Journal of Chemical Physics* **152**, 184107 (2020).
83. Forli, S. *et al.* Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc* **11**, 905–919 (2016).
84. Cousins, K. R. Computer Review of ChemDraw Ultra 12.0. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8388–8388 (2011).
85. *Understanding Molecular Simulation*. (Elsevier, 2002).
doi:10.1016/B978-0-12-267351-1.X5000-7.
86. GaussView 6 | Gaussian.com. <https://gaussian.com/gaussview6/>.
87. Galeazzi, R. Molecular Dynamics as a Tool in Rational Drug Design: Current Status and Some Major Applications. *CAD* **5**, 225–240 (2009).
88. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. & Im, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* **29**, 1859–1865 (2008).

89. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **26**, 1701–1718 (2005).
90. Kumari, R., Kumar, R., Open Source Drug Discovery Consortium & Lynn, A. *g_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1951–1962 (2014).
91. Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269–275 (1994).
92. Bassler, B. L. Small Talk. *Cell* **109**, 421–424 (2002).
93. Liu, H. B., Koh, K. P., Lee, J. H., Kim, J. S. & Park, S. Characterization of LasR protein involved in bacterial quorum sensing mechanism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Bioproc E* **14**, 146–154 (2009).
94. Sadiq, S. *et al.* Virtual Screening of FDA-Approved Drugs against LasR of *Pseudomonas aeruginosa* for Antibiofilm Potential. *Molecules* **25**, 3723 (2020).
95. Irwin, J. J. *et al.* ZINC20—A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **60**, 6065–6073 (2020).

96. Bank, R. P. D. RCSB PDB - 2V50: The Missing Part of the Bacterial MexAB-OprM System: Structural determination of the Multidrug Exporter MexB. <https://www.rcsb.org/structure/2V50>.
97. *Homology Modeling: Methods and Protocols*. (Humana Press, New York, NY Heidelberg, 2012).

Ringrazio la Prof.ssa Roberta Galeazzi per avermi concesso la possibilità di svolgere la mia tesi di laurea all'interno del suo laboratorio, rimarranno in me ricordi indelebili della sua disponibilità e della sua gentilezza che mi hanno interamente accompagnato nei mesi in cui ho frequentato il laboratorio.

Ringrazio la Dott.ssa Giorgia Giorgini per essere sempre stata disponibile per ogni aiuto, anche banale, da me richiesto e per tutti i suggerimenti che mi sono stati dati durante la stesura di questa tesi di laurea.

Ringrazio mia madre, mio padre ed ogni membro della mia famiglia per il costante supporto che mi hanno dato, senza di voi sarebbe stato impossibile farcela.

Ringrazio i miei coinquilini Giulio e Simone per l'infinito tempo passato insieme, per tutto quello che ci siamo detti e per tutto il supporto morale ricevuto che ha reso meno pesante ogni passo compiuto fino a questo traguardo.

Ringrazio tutti i miei amici di San Paolo (e non): gli Ndacconi e gli Omini Pover, separati da molti chilometri ma certi di esserci sempre l'uno per l'altro.

Ringrazio, infine, ogni persona incontrata nel mio percorso di studi ad Ancona, ognuno ha composto un piccolo tassello di questa laurea (ma anche della precedente) grazie a preziosi consigli, aiuti, svago e risate. Menzione d'onore

*voglio darla ai [REDATTO] di Riace per aver reso più leggera questa
esperienza vissuta durante questo corso di Laurea magistrale.*

Porterò per sempre ognuno di voi nel mio cuore.

*Infine, voglio mandare un piccolo messaggio a chiunque arriverà a leggere
questa ultima pagina: non permettete mai a nessuno di alterare la vostra visione
del mondo. Vivete le situazioni della vita senza farvi condizionare dai
comportamenti altrui. Date il giusto peso alle relazioni con le altre persone e
non fatevi inghiottire dalla pressione che queste possono creare. Non credetevi
mai peggiori di qualcuno in partenza, l'ho capito a mie spese. Infine, non
vergognatevi mai di qualunque cosa facciate o vi piaccia, sono importanti tratti
distintivi della vostra personalità e contribuiscono a rendervi unici in mezzo a
quasi otto miliardi di persone.*

Siete solo voi e nessun altro.

“Hold your colour”