UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia Molecolare e Applicata

SVILUPPO DI UN MODELLO DI INIBIZIONE PER LA RICERCA DI NUOVI COMPOSTI BIOATTIVI DIRETTI CONTRO LA POMPA DI EFFLUSSO AcrAB-TolC NEL SUPERAMENTO DI ANTIBIOTICO-RESISTENZE IN *Escherichia coli*.

3D INHIBITION SITES MAPPING FOR *Escherichia coli* AcrAB-TolC EFFLUX PUMP IN THE SEARCH OF NOVEL EPIs.

Tesi di Laurea Magistrale

Dott. Nicola Raulli

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa Roberta Galeazzi

Sessione Estiva

Anno Accademico 2021/22

A sogni più grandi

A immensi traguardi

A sguardi infuocati

in tramonti incantati

E in notti fatate

abbracci Stellati

PER ASPERA AD ASTRA

INDICE

1. Introduzione

1.1 Antibiotico-resistenza……..1

1.2 *Escherichia coli*……3

1.3 Breve excursus sui principali meccanismi di antibiotico-resistenza presenti in *Escherichia coli*…….....7

1.3.1 AcrAB-TolC: struttura, meccanismo d'azione e substrati estrusi……10

1.4 Inibitori delle pompe di efflusso (EPI)……...18

1.4.1 Berberina e derivati…….20

2. Scopo della tesi

3. Materiali e metodi

3.1 Visualizzazione 3D molecolare: USFC Chimera……...23

3.2 Metodi di calcolo dell'energia molecolare nella meccanica molecolare…….24

3.2.1 AMBER e altri campi di forza…….29

3.3 Molecular docking…….32

3.3.1 AutoDock……36

3.4 High-Throughput Virtual Screening……..42

3.4.1 AutoDock Vina……...43

4. Risultati e discussione

4.1 Strutture della pompa di efflusso AcrB trovate: struttura scelta e collezione degli inibitori d'interesse co-cristallizzati presenti nelle altre……...45

4.2 Riproduzione in silico dei dati sperimentali e mappatura della *deep binding pocket*……...*51*

4.3 Docking della berberina e dei suoi derivati nella *deep binding pocket*……*56*

4.3.1 Berberina…….58

4.3.2 13-(4-trifluoromethylbenzyl)-berberine (p-CF_3)…….60

4.3.3 13-(2-methylbenzyl)-berberine (o-CH_3)…….62

4.3.4 13-(4-methylbenzyl)-berberine (p-CH_3)…….64

4.3.5 Discussione…….66

4.4 Identificazione di altri possibili siti di binding presenti in AcrB per la berberina e derivati…….67

4.4.1 Sovrapposizione di AcrB a MexY per riprodurre la posa di o-CH_3-berberina nel *sito di inibizione*……..……69

4.4.2 Nuovo blind docking di berberina e derivati nel dominio Porter e focused docking delle pose migliori nel *sito d'inibizione* e in quello *vestibolare*……76

4.4.2.1 o-CH_3-berberine……...79

4.4.2.2 p-CH_3-berberine……...80

4.4.2.3 p-CF_3-berberine……...……81

4.4.2.4 Berberina……..82

4.4.2.5 Discussione……..83

4.5 Stato dell'arte sugli EPI noti per AcrB……86

4.6 Creazione libreria EPI noti……...102

4.7 Virtual Screening degli EPI noti sul dominio Porter e analisi dei risultati…….103

5. Conclusione

5.1 Possibili ampliamenti futuri…….110

6) Bibliografia

INTRODUZIONE

1.1 Antibiotico-resistenza

Un antibiotico è un agente chimico in grado di uccidere o inibire la crescita di alcuni microrganismi che, per le loro caratteristiche morfologiche o fisiologiche, sono sensibili al farmaco. Possono agire sia su una via metabolica essenziale sia avere una tossicità maggiormente selettiva (Munita 2016).

L'antibiotico-resistenza rappresenta un'emergenza clinica, sociale ed economica molto grave che si verifica quando i batteri, attraverso diversi meccanismi, diventano resistenti ai farmaci e non responsivi ai trattamenti (AIFA 2020). Nel 2019 sono stati stimati 1.27 milioni di decessi nel Mondo a seguito di infezioni causate da microrganismi antibiotico-resistenti (AMR) (ECDC 2020).

L'origine del fenomeno è da ricercare nell'uso eccessivo e irresponsabile degli antibiotici: i microrganismi, vivendo in ambiente più selettivo, sviluppano meccanismi e caratteristiche in grado di proteggerli dagli antibiotici per non soccombere alla selezione "artificiale". Altra causa alla base del fenomeno è dovuta allo scarso interesse delle case farmaceutiche nello sviluppo di nuovi antibiotici perché le ricerche sono molto lunghe ed esose e i microrganismi

sviluppano velocemente resistenza ai nuovi farmaci rendendo vani gli sforzi (Kraemer 2019).

L'antibiotico-resistenza può essere *intrinseca*, dovuta alla struttura o al metabolismo del batterio che lo rendono insensibile al farmaco (non coinvolge geni specifici) o *acquisita* a seguito di mutazioni, selezione clonale (endogena) o attraverso geni eterologhi e trasferimento genico orizzontale (esogena). L'insieme dei geni che portano le informazioni per i meccanismi di antibiotico-resistenza, in un organismo, prende il nome di *resistoma* (Hasan 2020).

Tra i molti meccanismi attraverso i quali un microrganismo riesce a diventare resistente annoveriamo il rendere inaccessibile il bersaglio al farmaco (ad esempio diminuendo la permeabilità della membrana impedendo così l'ingresso dell'antibiotico nella cellula), modificare il farmaco inattivandolo (reazioni catalizzate da enzimi batterici come ad esempio le β-lattamasi o le carbapenemasi), modificare il target del farmaco rendendo *de facto* il microrganismo intrinsecamente resistente al composto o espellendo il farmaco dalla cellula tramite *pompe di efflusso* (Hasan 2020).

1.2 Escherichia coli.

Escherichia coli è un bastoncino Gram-negativo, anaerobio facoltativo, asporigeno, mobile per la presenza di flagelli peritrichi distribuiti su tutta la superficie cellulare e provvisto di pili (Allocati 2013).

Fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* che include un gran numero di batteri il cui habitat naturale è costituito dall'intestino dell'uomo e altri animali. Questi batteri sono accomunati da caratteristiche antigeniche e biochimiche simili e, sulla base di queste, resta difficile classificarli in gruppi nettamente distinti in quanto molti presentano caratteri intermedi (Pitout 2008).

Gli enterobatteri causano patologie in sede ectopica o in proporzioni squilibrate (*disbiosi*). L'intero gruppo potrebbe essere definito come un *continuum di biotipi* con molti caratteri comuni e intermedi, di fondamentale importanza è quindi l'identificazione dei *fattori di virulenza* acquisiti, spesso più importanti della classificazione di specie, per determinare il *potenziale di patogenicità*: trattandosi di una famiglia di batteri molto adattati ai vertebrati l'acquisizione di PAI può avere risvolti estremamente negativi sull'ospite (Pitout 2008).

Un ceppo batterico possiede peculiari caratteristiche genetiche che influenzano il *fenotipo*; il *sierotipo* distingue batteri, appartenenti alla stessa specie, con *varianti antigeniche* diverse che riflettono la presenza di informazioni

genetiche aggiuntive. Per esempio, *E. coli* è un importante commensale del microbiota intestinale ma, l'acquisizione di PAI plasmidici o batteriofagici, può far insorgere caratteri virulenti che vanno a danneggiare l'ospite come in *E. coli* K1 che possiede l'antigene capsulare 1 con spiccato carattere anti-fagocitario ed è responsabile di meningiti neonatali molto pericolose oppure gli *E. coli* emorragici EHEC identificati tramite la caratterizzazione degli antigeni somatici O157/H7 (Kaper 2004).

Antigeni presenti (Ørskov 1992):

- antigene O: lipopolisaccaride presente in tutti i Gram-negativi, componente lipidica rappresentata da un'*endotossina* che contribuisce alla tossicità mentre la porzione polisaccaridica esterna forma l'antigene;
- antigene K o capsulare: strato di polisaccaridi acidi che formano una capsula mucosa che sovrasta l'antigene O;
- antigene H: caratteristico delle enterobatteriacee mobili perché è costituito dalle proteine flagellari;
- antigene F: fimbriale.

E. coli è un importante commensale del microbiota intestinale e viene valutato per quantificare la *contaminazione fecale* delle acque. Alcuni ceppi sono patogeni, uguali agli altri dal punto vista morfologico e biochimico: necessitano di analisi sierologiche e molecolari per essere identificati e possono provocare patologie a livello intestinale ed extra-intestinale (Kaper 2004):

- enterobatteri invasivi non enterotossici colpiscono la porzione distale dell'intestino tenue e crasso causando *dissenteria* (infiammazione della mucosa intestinale distale provocata da infezione degli enterociti con distacco di strati della mucosa e feci sanguinolente e purulente) e *diarrea* (diminuita capacità di assorbimento dei liquidi con forte perdita degli stessi) (Hallam 2022);
- alcuni ceppi di *E. coli* non sono invasivi ma enterotossici e colpiscono, invece, l'intestino tenue provocando diarrea perché stimolano la secrezione della mucosa pur non arrecandovi lesioni (Hallam 2022);
- infezioni extra-intestinali prevalentemente urinarie in ambito nosocomiale ma anche respiratorie e di ferite chirurgiche, fino alla sepsi. Quasi sempre sono causate da alcuni ceppi di *E. coli* in sede ectopica responsabili del 50% delle *setticemie* in ambito ospedaliero! *E. coli* è responsabile di oltre il 90% delle infezioni urinarie (infezioni endogene per via ascendente) dove l'adesione è mediata da adesine (soprattutto fimbriali). Sensibili

specialmente gli individui di sesso femminile che sono più sensibili per cause anatomiche (uretra più corta e distanza minore dall'orifizio anale) (J. R. Johnson 2002).

Ceppo	**Antigeni**	**Patologia**
K1	K1	Meningite neonatale
UPEC uropatogeni	O4 - O6 - O75	Cistiti e pielonefriti comunitarie
Ceppi che causano gastroenteriti		
DAEC diffusamente aggreganti	Ancora non identificati	Diarrea infantile
EAEC enteroaggreganti	O3 - O15 - O44 - O51 - O77 - O86 - O92 O111 - O113 - O126 - O141	Diarrea infantile
EHEC enteroemorragici (come i ceppi STEC)	O26 - O157 - O111 - O91	Coliti emorragiche e della sindrome emolitico-uremica
EIEC enteroinvasivi	O28ac - O29 - O124 - O136 - O143 - O144 O152 - O164 - O167	Dissenteria bacillare
EPEC enteropatogeni	O55 - O86 - O111 - O114 - O125 - O126 O127 - O128ab - O142	Diarrea infantile
ETEC enterotossigeni	O6 - O8 - O15 - O20 - O25 - O27 - O63 - O78 O80 - O85 - O115 - O128AC - O139 - O148 O153 - O159 - O167	Diarrea infantile e del viaggiatore

Tabella 1.1. *Sono riportati i principali patotipi di E. coli, gli antigeni che lo identificano e la patologia provocata. Il microrganismo, se acquisisce fattori di virulenza o si trova in sede ectopica può divenire molto pericoloso per l'ospite provocando patologie a livello intestinale ed extra-intestinale.*

1.3 Breve excursus sui principali meccanismi di antibiotico-resistenza presenti in Escherichia coli

In *Escherichia coli* sono riportati molti meccanismi di antibiotico-resistenza.

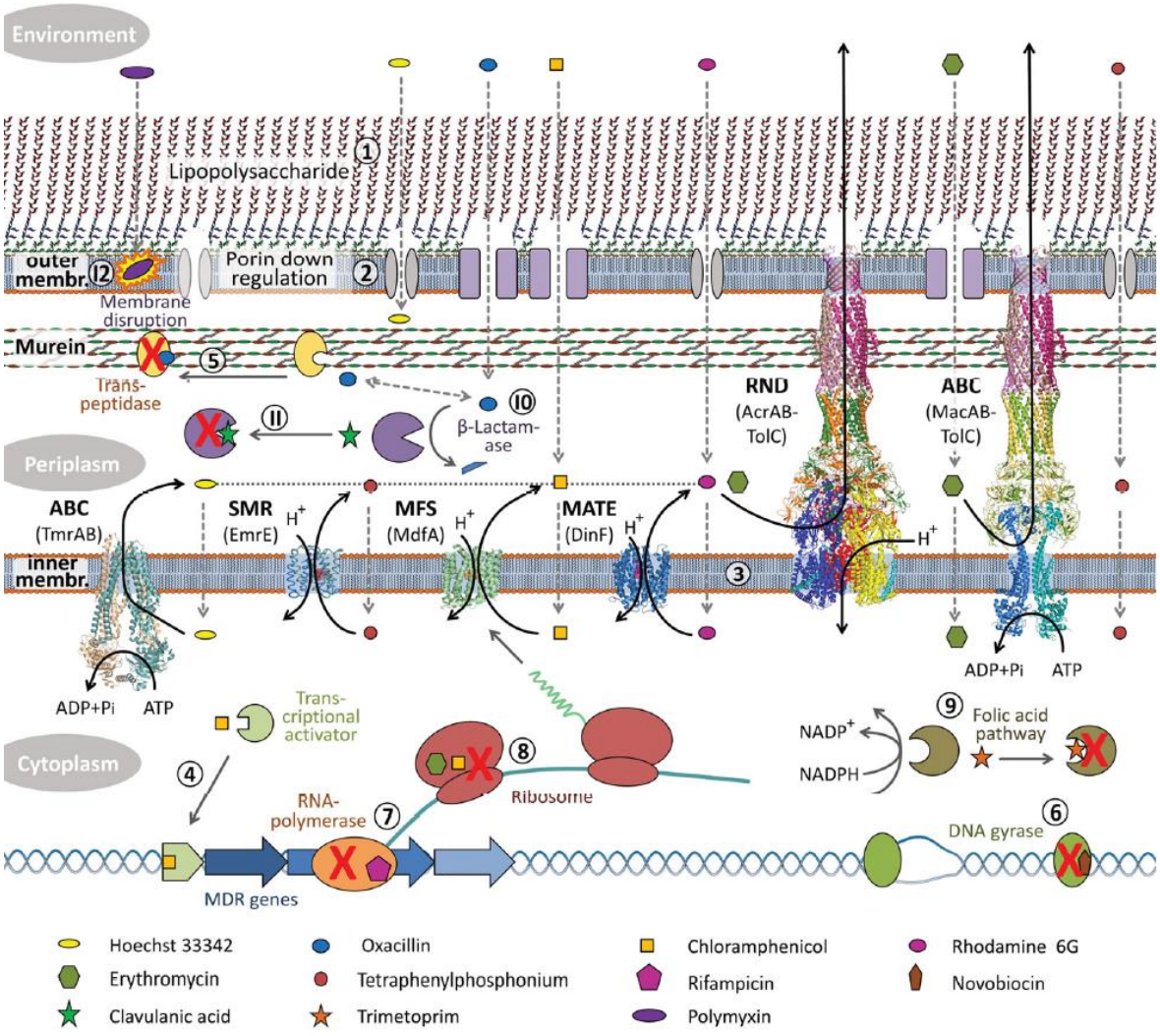


Figura 1.1. *Panoramica dei diversi meccanismi di antibiotico-resistenza presenti in Escherichia coli (Kobylka et al., 2019).*

La bassa permeabilità della membrana esterna lipofila, formata da un doppio strato asimmetrico di fosfolipidi con molecole di lipopolisaccaride, costituisce già un elemento di antibiotico-resistenza *intrinseca* nei batteri gram-negativi. La via lipidica è quella utilizzata dalle sostanze lipofile, antibiotici compresi, per entrare nella cellula mentre le sostanze idrofile penetrano nel batterio attraverso porine di diffusione generale (OMP). L'alterazione nella permeabilità di queste porine è un'altra strategia messa in atto dal microrganismo per limitare l'accesso di sostanze potenzialmente dannose all'interno della cellula (Ghai 2018).

Sono stati documentati ceppi di *E. coli* resistenti a molte classi di antibiotici come β-lattamici, chinoloni, fluorochinoloni, aminoglicosidi, fosfomicina, tetracicline, fenicoli, sulfamidici, trimetoprim, polimixine (polipeptidi con attività antimicrobica). L'antibiotico-resistenza avviene principalmente per modifica della via metabolica (I), alterazione del target terapeutico (II), produzione di enzimi capaci di inattivare il farmaco (III) o espellendo il composto farmaceutico tramite specifiche pompe d'efflusso (IV) (Poirel 2018).

Le *Multidrug Efflux Pump* (MDEP) sono dei trasportatori proteici deputati all'estrusione di sostanze di scarto o tossiche per la cellula. Sono presenti sei famiglie di trasportatori in *E. coli*: *ATP-binding cassette* (ABC), *small multidrug resistenze* (SMR), *proteobacterial antimicrobial compound efflux*

(PACE), *facilitator superfamily* (MFS), famiglia *multidrug and toxin extrusion* (MATE), *resistance-nodulation-cell division* (RND). Questi sistemi proteici di efflusso sono molto presenti sulla parete della cellula batterica andando a rappresentare uno dei principali meccanismi di antibiotico-resistenza in *E. coli* (Higgins 2007).

1.3.1 AcrAB-TolC: struttura, meccanismo d'azione e substrati estrusi

La pompa di efflusso AcrAB-TolC (MDEP, *multidrug efflux pump*) presente in *Escherichia coli* rappresenta uno dei meccanismi più efficaci con cui il batterio riesce ad estrudere un'ampia gamma di molecole come sostanze tossiche, antibiotici, coloranti, detergenti e solventi (Li 2015).

Potrebbe essere classificata come un meccanismo di antibiotico-resistenza *intrinseco* perché sono costitutivamente presenti nella cellula procariotica ma, siccome si è osservato sperimentalmente che la presenza di antibiotici induce l'*over-espressione* della pompa d'efflusso, è più corretto definirla come un meccanismo di antibiotico resistenza *acquisito* o *adattativo* (Fernández 2012).

Riducendo la quantità di farmaco all'interno della cellula permette al batterio di perfezionare altri meccanismi di antibiotico-resistenza, come ad esempio la produzione di enzimi diretti contro gli antibiotici, che richiedono di maggior tempo e sforzo metabolico in quanto costituiscono sistemi inducibili non costitutivamente presenti nella cellula (Nolivos 2019).

Il complesso proteico AcrAB-TolC funge da trasportatore extracellulare e si posiziona nella parete batterica. Nei batteri Gram-negativi troviamo una membrana interna formata da un doppio strato fosfolipidico e una esterna

costituita anche da lipopolisaccaridi. Lo spazio circoscritto dalle due membrane prende il nome di periplasma (Anes 2015).

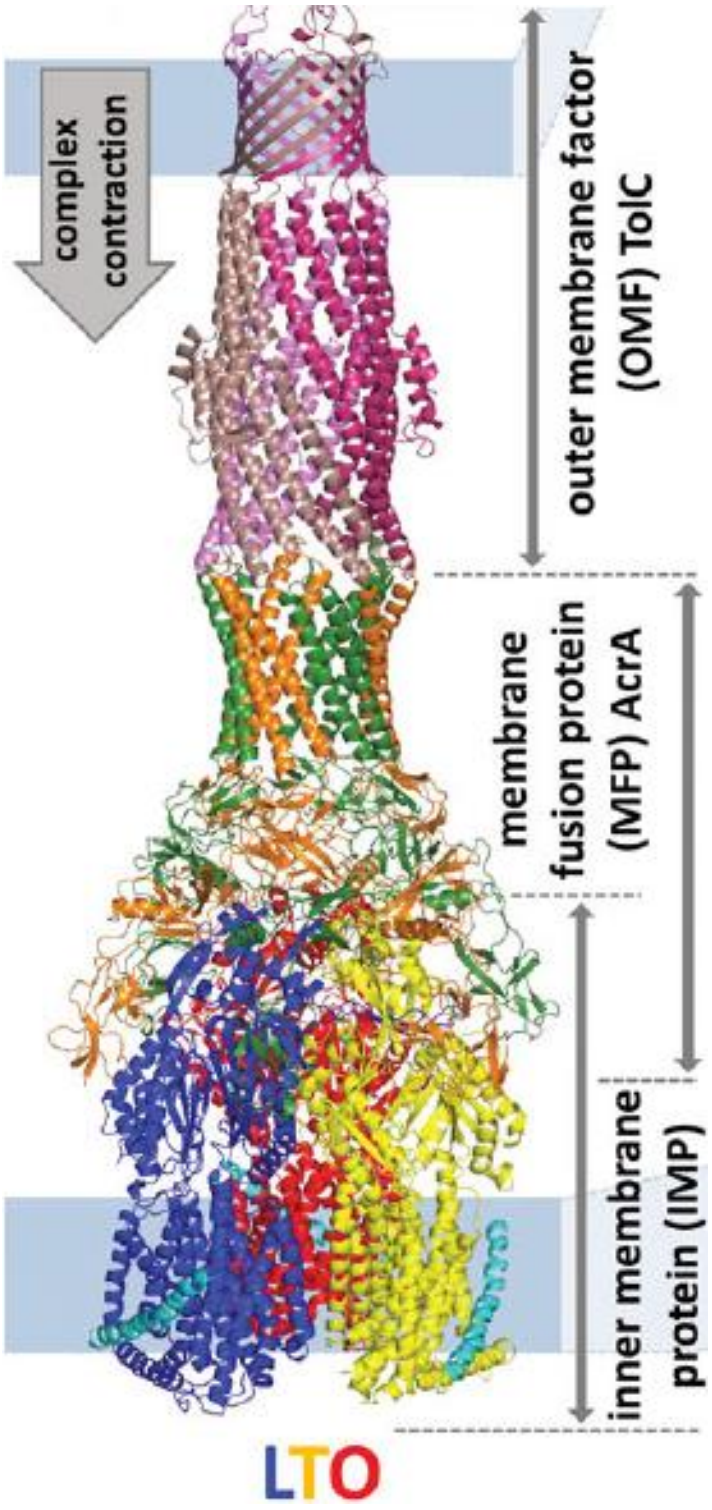


Figura 1.2. *Struttura del complesso AcrAB-TolC (Kobylka et al., 2020).*

Il complesso è multiproteico tripartito, all'interno le proteine sono presenti in rapporto stechiometrico 3:6:3 (AcrB-AcrA-TolC) (Kobylka 2020):

- AcrA (MFP, membrane fusion protein) ha funzioni strutturali, ancorando AcrB a TolC, che si riflettono sulla funzione dell'intero complesso (si è infatti osservato che la sua delezione va ad inficiare l'efficienza della pompa) (M. K. Higgins 2004);
- AcrB è la componente proteica fondamentale che costituisce il motore principale della pompa di efflusso, è ancorata alla membrana interna e sporge nello spazio periplasmatico (Eicher 2012);
- TolC (OMP, outer membrane protein) forma un canale di membrana esterno per espulsione dei substrati attraverso la membrana esterna (Koronakis 2000).

AcrB (Acriflavine resistance B) è una pompa di tipo RND (resistance, nodulation and cell division). Questa famiglia proteica è ampiamente diffusa in tutti i domini della vita, attestando l'antichissima origine evolutiva di queste pompe che assolvono molte funzioni cellulari essenziali (Tseng 1999).

In *E. coli* troviamo anche altri nove rappresentati di questa famiglia come AcrD che forma sempre un complesso tripartito (AcrAD-TolC) ma, per le sue

caratteristiche chimico-fisiche, espelle meglio i substrati idrofilici (mentre AcrB preferisce quelli di tipo idrofobico) (Rosenberg 2000).

Il trasporto è di tipo *attivo* alimentato da un gradiente elettrochimico, la forza motrice protonica fa sì che la pompa sia altamente efficiente nell'esplicare la sua funzione tramite meccanismo *antiporto* (farmaco/protoni) (Reading 2020).

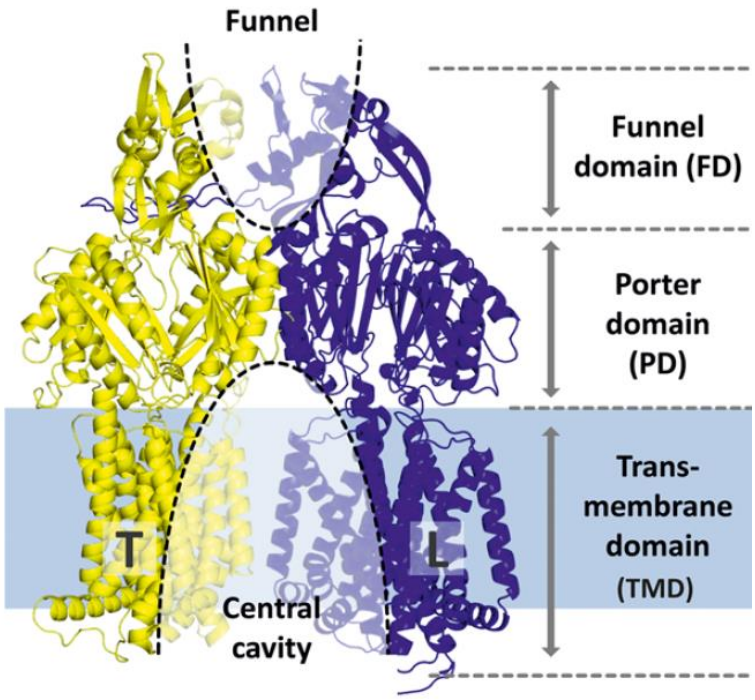


Figura 1.3. *I tre domini che compongono AcrB (Kobylka et al., 2020).*

La pompa AcrB è formata da un omotrimero costituito da tre domini principali:

- dominio *Transmembrana* ancorato alla membrana interna costituito, rispettivamente per ogni monomero, da 12 eliche transmembrana organizzate in un due gruppi (*bundles*), TM1-6 e TM7-12 disposti in maniera pseudo-simmetrica tra di loro. Tra TM1-TM2 e TM7-TM8 sono

presenti due grandi *loops*. Le 36 TM concorrono a formare una cavità centrale esagonale riempita da lipidi. In questo dominio è contenuta la rete di trasmissione che dirige i protoni per formare il gradiente elettrochimico attraverso la membrana che aziona la pompa (Nikaido 2018).

- dominio *Porter* dove sono presenti 4 sub-domini, due all'estremità N-terminale (PN1 e PN2) e due all'estremità C-terminale (PC1 e PC2) della proteina; i sub-domini sono separati dai loops TM. Nel dominio porter troviamo la *Prossimal Binding Pocket* (o *Access Pocket*) e la *Deep Binding Pocket* che traslocano il substrato che deve essere espulso. Nel dettaglio, nel dominio PC troviamo il sito *Cleft* (tra PC1 e PC2) l'*Access Pocket* e la *Deep Binding Pocket*. Queste due tasche sono articolate durante il meccanismo di traslocazione dallo switch-loop (Brandstätter 2011).

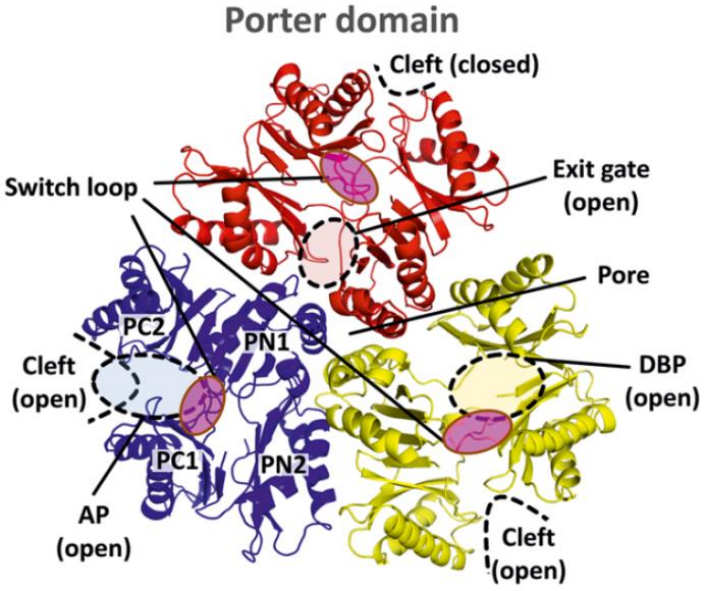


Figura 1.4. *I sub-domini presenti nel dominio Porter nelle diverse conformazioni (Kobylka et al., 2020).*

- dominio *funnel*, riveste un ruolo chiave per la trimerizzazione del complesso, è attraversato dal canale di uscita che riversa le molecole estruse in TolC (Brandstätter 2011).

La pompa di efflusso AcrB intercetta sostanze potenzialmente dannose per la cellula principalmente nello spazio periplasmatico e mediante diverse vie d'accesso (via vestibolare, Cleft e via attraverso le eliche trans-membrana) le trasporta eppoi convoglia all'esterno della cellula procariotica (Li 2015).

Il meccanismo d'azione prevede una rotazione concertata di AcrB, accorpata alla generazione del gradiente protonico che avviene nel dominio transmembrana (Pos 2009).

Durante il suo funzionamento, l'asimmetricità sequenziale di ogni protomero permette di distinguere tre differenti conformazioni (Reading 2020):

- *Loose* (o *access*) che permette il legame del substrato alla tasca prossimale (PDP) che, in questa conformazione, è più voluminosa rispetto la distale;
- *Tight* (o *binding*): il cambio conformazionale provoca l'avanzamento del substrato dalla tasca prossimale alla tasca distale (DBP), dovuto anche allo spostamento dello switch loop;

- *Open* (o *extrusion*) con rilascio del substrato all'interno del canale centrale o funnel domain (FD), dove proseguirà attraverso TolC per essere definitivamente espulso dalla cellula.

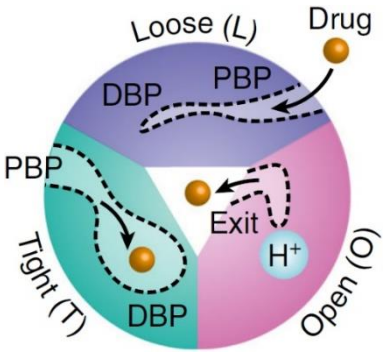


Figura 1.5. *Meccanismo di espulsione sequenziale del substrato nelle tre conformazioni asincrone (Reading et al., 2020)*

La pompa AcrB mostra un'ampia varietà di substrati estrudibili; quelli preferenziali sono di natura idrofobica, ma anche le sostanze anfifiliche vengono ben espulse. Tra le sostanze estruse troviamo, tra le altre, β-lattamici, cloramfenicolo, eritromicina, fluorochinoloni, macrolidi, novobiocina e tetracicline (Poirel 2018).

Diversi studi, dove vengono testati moltissimi antibiotici, vanno a quantificare la differenza di efficienza degli stessi in ceppi di *E. coli* dove la pompa è deleta e in ceppi *wild type*. I casi in cui viene osservata una grande differenza di prestazione dell'agente chemioterapico indicano quindi che, nei ceppi *wild type*, essi non riescono ad agire correttamente perché la loro concentrazione

nella cellula è resa molto più bassa dall'azione delle pompe di efflusso (Li 2015) (T. J. Opperman 2014) (Tambat 2022).

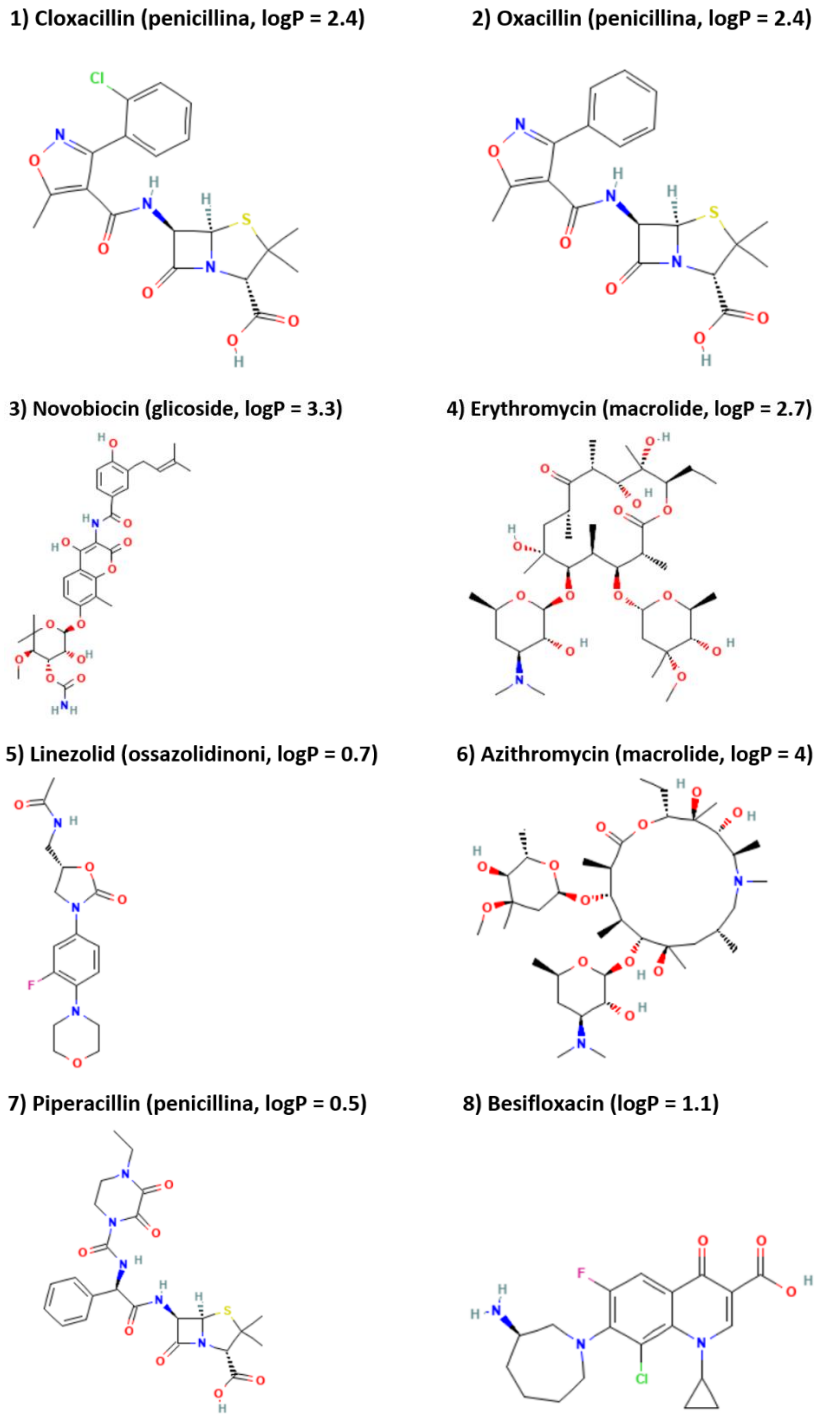


Figura 1.6. *Alcuni antibiotici che vengono massivamente estrusi dalla pompa. Dati sperimentali utilizzati per fare i calcoli presenti nelle ricerche indicate.*

1.4 Inibitori delle pompe di efflusso (EPI)

Gli inibitori delle pompe di efflusso (EPI) sono composti, di origine naturale, semi-sintetica o sintetica, capaci di bloccare le pompe di efflusso ripristinando così la sensibilità del batterio agli antibiotici che, non venendo espulsi (o venendo espulsi solo in minima parte), riescono a raggiungere le concentrazioni necessarie per svolgere la loro azione terapeutica (MIC o MBC a seconda se abbiano azione *batteriostatica* o *battericida*) diretta contro la cellula procariotica patogena (Sharma 2019).

Pur non possedendo attività antibatterica in *sensu stricto*, l'uso sinergico di EPI con antibiotici rappresenta un approccio molto promettente nel contrastare le antibiotico-resistenze, specialmente nei ceppi MDR (Seukep 2020).

Tra i più efficienti nel bloccare la pompa d'efflusso AcrB di *Escherichia coli* troviamo PAβN, CCCP e MBX-2319.

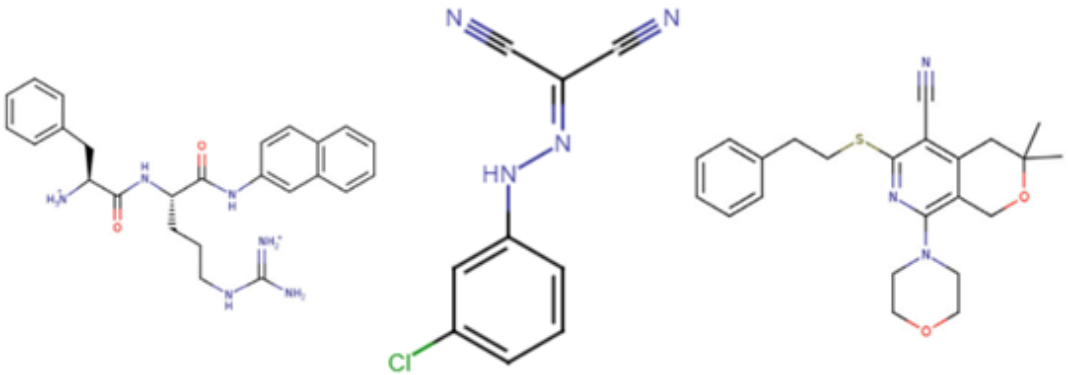


Figura 1.7. *Da sinistra a destra: PAβN, CCCP e MBX-2319.*

Il *phenylalanine arginine* β-*naphthylamide* (PAβN) svolge un'attività inibitoria competitiva con le molecole di substrato rendendo inefficiente il funzionamento della pompa d'efflusso1. Tra i primi EPI testati contro le pompe di efflusso che conferiscono MDR in *Pseudomonas aeruginosa*: troviamo studi già dal 2001 che documentano la sua elevata efficienza ed è molto presente in letteratura. Elevata tossicità (Lomovskaya 2001) (Aparna 2014).

Il *carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* (CCCP) può essere definito come un EPI in senso *lato* in quanto possiede un'attività diseccitante sulle membrane cellulari: sì facendo va ad interferire anche con il flusso protonico che genera il gradiente elettrochimico che alimenta la pompa, bloccando *de facto* la sua azione in maniera indiretta. Poco specifico, risulta tossico per le cellule in generale, siano esse eucariotiche o procariotiche (Aparna 2014).

Una classe di composti molti interessanti per le loro proprietà inibitrici sulla pompa di efflusso AcrB di *E. coli* sono le piranopirimidine: MBX-2319 è una più studiate ed efficienti nell'inibizione (Vargiu 2014).

1.4.1 Berberina e derivati

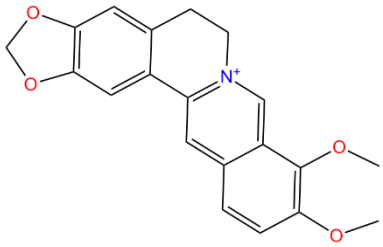


Figura 1.8. *Berberina.*

La *berberina* è un alcaloide vegetale isolato, per la prima volta, da *Berberis fremontii*. Composto di colore giallo intenso e dal sapore amaro; è presente in semi, corteccia, radici, fusti, anche quelli sotterranei detti *rizomi*, delle piante del genere *Berberis* (queste sono diffuse nel Nord Africa, in tutta l'Eurasia e nel continente americano). È un sale di ammonio quaternario appartenente al gruppo degli *alcaloidi benzilisochinolinici*; la sintesi della berberina avviene *esclusivamente* in sistemi biologici (Tillhon 2012).

Questa molecola sta avendo molto risalto nella ricerca ed è molto studiata perché possiede moltissime proprietà: antinfiammatorie, antiaritmiche, antimicrobiche, antitumorali, ipocolesterolemizzanti e ipoglicemizzanti. Inoltre, con i dosaggi comunemente utilizzati, la berberina sembra essere ben tollerata e sicura mentre elevati dosaggi possono risultare tossici (i principali effetti collaterali includono un abbassamento della pressione, dispnea, disturbi gastrointestinali, sintomi simil-influenzali e alterazioni cardiache) (Khan 2022).

Durante il mio lavoro di tesi ho anche valutato le proprietà di legame e le interazioni con la pompa AcrB di *E. coli* della berberina e dei suoi derivati 13-(2-methylbenzyl)-berberine$^{O\text{-}CH3}$, 13-(4-methylbenzyl)-berberine$^{P\text{-}CH3}$ e 13-(4-trifluoromethylbenzyl)-berberine$^{P\text{-}CF3}$ perché, testate sia *in silico* sia *in vitro* sull'omologa pompa di efflusso MexY di *P. aeruginosa*, hanno mostrato ottima attività EPI (Giorgini 2021) (Laudadio 2019).

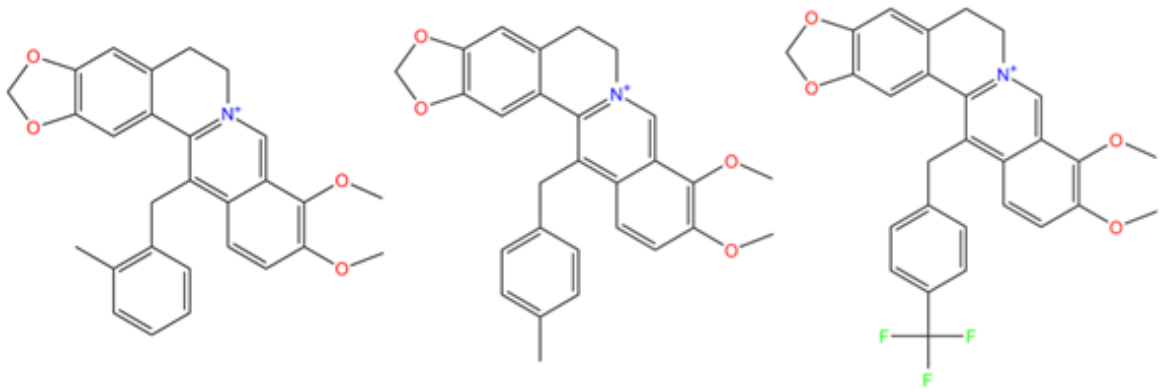


Figura 1.9. *Da sinistra a destra: o-CH_3, p-CH_3 e p-CF_3.*

SCOPO DELLA TESI

Il mio lavoro di tesi si è concentrato sullo studio di una strategia di inibizione del meccanismo di antibiotico-resistenza mediato dalla pompa d'efflusso AcrB presente in *Escherichia coli*.

AcrB è stata studiata ed analizzata dettagliatamente a livello topologico per individuare i siti di legame più importanti utilizzabili come possibili *target* per gli EPI.

Sono state testate *in silico* la berberina e tre suoi derivati su AcrB di *E. coli*, già dimostratesi efficienti nell'inibire l'omologa pompa di efflusso MexY di *Pseudomonas aeruginosa* sia in esperimenti *in silico* sia *in vitro*.

Inoltre, è stata visionata molta della letteratura disponibile su AcrB per collezionare EPI noti che sono stati poi testati sulla pompa d'efflusso.

MATERIALI E METODI

3.1 Visualizzazione 3D molecolare: USFC Chimera

USFC Chimera è un programma per la visualizzazione tridimensionale delle strutture molecolari provvisto di numerosi strumenti per l'analisi strutturale e delle proprietà chimico-fisiche (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/).

Con Chimera si possono aprire i file in diversi formati, tra cui il formato .pdb che rappresenta un formato standard per le strutture proteiche e che deriva originariamente dalla baca dati strutturale Protein Data Bank del Brookhaven National Laboratory (www.rcsb.org/pdb); tale software permette di utilizzare le righe di comando o l'interfaccia grafica GUI per selezionare singoli atomi, gruppi funzionali, amminoacidi (anche raggruppati per caratteristiche chimico-fisiche), parti della proteina come una sola catena o l'intera struttura, evidenziarli e colorarli nei più svariati modi e sottoporli ad analisi.

La grande versatilità dei comandi ci permette di indagare su ogni aspetto desiderato di una molecola. Inoltre, alcune funzioni come l'eliminazione del solvente o l'aggiunta degli idrogeni (che in macromolecole risolte con la tecnica della cristallografia a raggi X non vengono rilevati) sono molto importanti per la correttezza dei calcoli di meccanica molecolare, anche quelli eseguiti successivamente con altri programmi, come ad esempio AutoDock.

3.2 Metodi di calcolo dell'energia molecolare nella meccanica molecolare

La meccanica molecolare rappresenta un approccio della Chimica Computazionale per il calcolo delle energie molecolari, utilizza un modello in cui gli atomi sono trattati attraverso le leggi della fisica classica per riprodurre *in silico* il comportamento delle molecole (Leach 2001).

Tale metodica permette di descrivere le geometrie e calcolare accuratamente le energie molecolari per molte classi di composti in modo semplice. Il concetto alla base è che i legami hanno lunghezze e angoli "naturali" a cui le molecole in natura tendono, modificando la loro geometria per avvicinarsi a tali "valori ideali".

Con l'*approssimazione di Born-Oppenheimer* è possibile trattare il moto elettronico separato da quello nucleare. La meccanica molecolare non calcola espressamente il moto elettronico perché la molecola è vista come un insieme di masse (i *nuclei*) tenute assieme da forze elastiche e armoniche (i *legami*). Tali forze possono essere descritte da funzioni di energia potenziale legate a caratteristiche strutturali come lunghezza di legame, angolo di legame, interazioni di non legame (Leach 2001).

Particolarmente importante diviene perciò la scomposizione delle varie energie potenziali in gioco attraverso il processo di *parametrizzazione*: il campo di forza è descritto oltre che dai vari funzionali associati ai vari contributi energetici, da un insieme di parametri (costanti di forza, angoli e lunghezze di legame) che possono essere utilizzati per l'analisi di molecole diverse ma, essendo parte integrante di ciascun contributo di energia potenziale, non possono essere trasferiti tra campi di forza differenti (Cygan 2018).

Per attribuire questi parametri vengono considerati il tipo di atomo, la sua ibridazione, carica formale e gli atomi a cui è legato (ad esempio, AMBER attribuisce agli ossigeni carbonilici, ossidrilici ed esteri parametri differenti).

L'energia totale è definita come una somma dei seguenti contributi di potenziale (Cygan 2018):

$$E_{\mathrm{TOT}} = E_{Bond\ Stretch} + E_{Angle\ Bond} + E_{\omega} + E_{NB}$$

- L'$E_{Bond\ Stretch}$ è descritta dalla *legge di Hooke* dove due masse legate sono da una molla. La curva ottenuta con questa legge è una parabola: più è stretta e maggiore sarà l'energia (Cygan 2018).

$$E_{Bond\ Stretch} = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{2} k_s \left(R_i - R_{i_0}\right)^2$$

Quando osserviamo grandi deformazioni avremo una deviazione del potenziale armonico che descriviamo con il *potenziale di Morse*: il moto anarmonico considera l'energia di dissociazione e gli effetti della rottura del legame chimico (il potenziale di Morse descrive l'energia necessaria per deformare una molla, comparabile a un legame chimico, che al termine dello stress non ritorna più alla forma originale). Con questo parametro viene aggiunto un termine cubico a quello quadratico di Hooke per correggere il moto ideale.

- L'$E_{Angle\ Bond}$ è dovuta alla variazione degli angoli di legame e viene descritta sempre con la Legge di Hooke dove viene però considerato il valore dell'angolo di legame reale e quello ideale (Cygan 2018).

$$E_{Angle\ Bond} = \sum_{i=1}^{Q} \frac{1}{2} K_b \left(\theta_i - \theta_{i_0}\right)^2$$

I legami non sono rigidi: quando avviene una variazione dell'angolo sì ha anche una compressione o uno stiramento dei legami. I campi di forza che considerano questo fenomeno sono detti di *Urey-Bradley*, altrimenti possiamo inserire un termine crociato correttivo.

- E_ω descrive l'energia associata alla variazione degli angoli torsionali, rappresenta l'energia potenziale derivata dalla posizione dell'angolo di

torsione ottenuta con lo sviluppo in serie di Fourier dove viene rappresentata una funzione periodica mediante una combinazione lineare di funzioni sinusoidali (Cygan 2018).

$$E_{\omega} = \sum \left[\frac{1}{2}v_1(1 + cos\,\omega) + \frac{1}{2}v_2(1 + cos\,2\omega) + \frac{1}{2}v_3(1 + cos\,3\omega) + ..\right]$$

- E_{NB} è il contributo di energia potenziale e deriva dall'interazione di non legame tra coppie di atomi in funzione della distanza tra i nuclei. L'interazione può essere *di Van der Waals* o *elettrostatica*; quest'ultima è importante soprattutto nei sistemi *polari* ed è calcolata con il potenziale di Coulomb che considera l'interazione tra due cariche nello spazio (Cygan 2018).

$$E_{ij} = \sum_{1<j} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0}\frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

In sistemi *apolari* il calcolo del termine di Van der Waals assume molta importanza. È calcolabile con il *potenziale di Lennard-Jones* o quello *di Buckingham*. Il primo viene utilizzato in sistemi molto grandi perché è più approssimato mentre il secondo calcola meglio le interazioni reali della materia ma, la presenza del termine esponenziale, appesantisce di molto il calcolo. Entrambi i potenziali presentano due termini che descrivono un'interazione di tipo repulsivo e una di tipo attrattivo; A, B e C sono delle

costanti ricavate da dati sperimentali o da calcoli quantomeccanici (Leach 2001).

$$V_{LJ} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^{6}} \qquad V_B = A\exp(-Br) - \frac{C}{r^{6}}$$

Il valore soglia (*cutoff*) rappresenta il limite oltre il quale non consideriamo più significativo l'apporto di queste forze. È di 12 angstrom dove l'ångström (Å) è un'unità di lunghezza corrispondente a 0,1 nm o 10^{-10} m. Viene usato per indicare le dimensioni atomiche e le lunghezze dei legami chimici; non appartiene al Sistema Internazionale.

Uno dei principali limiti della meccanica molecolare è che, non considerando gli elettroni, diviene impossibile calcolare gli stati eccitati, di transizione o tutti quei processi in cui il ruolo degli elettroni è fondamentale. Tuttavia, quest'enorme svantaggio viene controbilanciato da una trattazione priva di un formalismo complesso e capace perciò di parametrizzare grandi molecole con sforzi computazionali limitati in termini di utilizzo di CPUs, adoperando per l'appunto parametri sperimentali (altro limite è intrinsecamente legato alla disponibilità di dati empirici) (Vanommeslaeghe 2014).

3.2.1 AMBER e altri campi di forza

Le principali differenze tra i diversi campi sono: la forma del funzionale usato per ogni termine energetico, i metodi di parametrizzazione e il numero di termini crociati introdotti. I campi di forza possono essere utilizzati per descrivere sistemi di grosse dimensioni come le proteine o di piccole e medie dimensioni come le molecole organiche (Leach 2001).

Nel primo caso parliamo di campi di forza di tipo I dove la forma del funzionale deve essere più semplice possibile per la componente $E_{STRETCHING}$ e E_{BOND}. Si assume la forma armonica di approssimazione non usando il termine cubico e i termini crociati mentre l'E_{VDW} è calcolato con il potenziale di Lennard-Jones.

AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) è uno dei campi di forza più utilizzato per descrivere molecole di grandi dimensioni come proteine e acidi nucleici, per le quali è stato sviluppato. La forma del funzionale è $E_S+E_B+E_W+E_{VDW}+E_{EL}+E_H-E_{BOND}$. Caratteristiche importanti sono l'armonicità, l'assenza di termini misti (crociati), l'uso del potenziale di Lennard-Jones per calcolare E_{VDW} e l'espressione canonica di Coulomb per calcolare il potenziale elettrostatico. Al termine di non legame affianca un termine aggiuntivo: il funzionale di energia potenziale dei legami idrogeno che viene quindi trattato qui in modo esplicito e separato dal potenziale di Coulomb (questi svolgono un ruolo fondamentale per stabilizzare le strutture

tridimensionali) e la trattazione separata dei *lone pairs* presenti sugli atomi di zolfo, capaci di dare interazioni più forti con altri gruppi polari (Wang 2004).

Nell'ambito della stessa classe di campi di forza, troviamo anche OPLS, un campo di forma in cui la forma del funzionale è molto simile a quella di AMBER. Le interazioni intramolecolari di non legame vengono calcolate solo per atomi con tre o più legami separati e i *lone pairs* non vengono considerati. Esso è stato ottimizzato per riprodurre in modo accurato le proprietà sperimentali dei liquidi come densità e calore di vaporizzazione. Sono inoltre ad esso associati set di parametri impliciti (*not all atoms*) che vanno a considerare gli atomi di idrogeno all'interno dei parametri del carbonio o altri eteroatomi (questo con la finalità di ridurre ulteriormente i tempi di simulazione e la quantità di risorse di calcolo utilizzate), sono chiamati OPLS-ua (*united atom*) mentre gli OPLS-aa (*all atom*) considerano esplicitamente ogni *atom type* per ciascun atomo della molecola (Guvench 2008).

Infine, CHARMM è un campo di forza che presenta differenti parametrizzazioni sia per sistemi proteici sia per sistemi lipidici (Guvench 2008).

I campi di forza di tipo II sono invece usati per molecole medio-piccole e sono più accurati, l'$E_{STRETCHING}$ e di E_{BOND} prevedono i termini cubici e l'E_{VDW} è calcolata con il potenziale di Buckingham.

MM2 usato per molecole organiche, l'E_{TOT} è la somma di $E_S+E_B+E_W+E_{NB}+E_{EL}-E_{BOND}$: il potenziale di stretching ha una forma cubica e considera l'anarmonicità, quello torsionale presenta anche il terzo termine e l'energia potenziale di non legame è di Buckingham; inoltre è presente il termine crociato (Leach 2001).

3.3 Molecular docking

Il *molecular docking* è una tecnica computazionale utile ad investigare l'interazione di due *partners* molecolari. In ambito chimico-biologico questa tecnica è applicabile nello studio dell'interazione tra un ligando e un bersaglio macromolecolare (o *target*) (G. M. Morris 2008).

Il termine docking significa "*attracco*": è una tecnica basata sulle strutture che cerca di trovare la migliore *posa di legame* ovvero quella a minore energia tra le due molecole calcolando l'energia di interazione (entalpia e energia libera di Gibbs di legame) per ogni loro orientamento spaziale reciproco. L'associazione implica complementarità geometrica e di proprietà e, nel docking molecolare, si cerca di determinare la geometria del complesso intermolecolare formato fra le due molecole (Fan 2019).

L'associazione fra le due molecole è basata su interazioni di varia natura (Leach 2001):

- le interazioni idrofobiche sebbene singolarmente siano le più deboli, nel complesso sono importanti nello stabilizzare le interazioni tra ligando e macromolecola (*forze di London* e *forze di Van der Waals*);
- le interazioni elettrostatiche, o coulombiane (tra dipoli, cariche e dipolo-dipolo indotto) singolarmente sono più forti delle Van der Waals ma, essendo presenti in numero più limitato, danno un contributo minore

all'energia totale rispetto alle interazioni idrofobiche ma caratterizzano spesso la specificità dell'interazione.

- i legami idrogeno, che sono particolari interazioni dipolo-dipolo, e contribuiscono in maniera importante a stabilizzare l'interazione tra molecole in ambiente biologico.

Il contributo del solvente svolge un ruolo estremamente importante durante l'interazione tra due molecole (per esempio nella formazione legami idrogeno specifici, ponti salini, etc.) ma è molto difficile da simulare: in molti programmi di docking l'effetto del solvente sullo stato delle interazioni viene omesso (G. M. Morris 2008).

L'energia di *binding* è la differenza di energia fra il complesso e le due molecole separate; anche l'entropia ha un impatto significativo sul *binding* (Leach 2001).

Durante il *docking molecolare* il ligando è posizionato all'interno del sito di legame del recettore e l'orientamento che assume nella tasca è valutato attraverso l'uso di una *funzione di score* che indica il punteggio dell'orientamento per capirne la bontà in base al valore energetico dell'interazione che viene ottimizzato in base alla complementarità elettrostatica, idrofobica e sterica (G. M. Morris 2008).

Si possono quindi trovare nuovi ligandi con elevata affinità e maggiore potenza con il sito bersaglio e investigare il loro meccanismo d'azione. La progettazione razionale di nuovi farmaci (*rational drug design*) è infatti uno degli scopi principali del docking.

Esistono diverse tecniche di docking: la più semplice consiste nel modificare la conformazione del ligando per trovare quale posa si lega meglio al sito di interesse della macromolecola, che viene trattata come statica (*rigid protein docking*). I sistemi più avanzati trattano sia il ligando che il recettore come molecole flessibili capaci di cambiare conformazione in maniera dipendente e reciproca ma, i metodi più avanzati di docking, richiedono maggiore potenza di calcolo e competenze; citiamo il *partial protein flexibility* dove solo al sito di legame della proteina è conferita una parziale flessibilità e quello *full protein flexibility* dove tutta la macromolecola è trattata come flessibile (Fan 2019).

Nel docking le coordinate della struttura della macromolecola sono indispensabili per procedere con la simulazione. In quello *rigido* queste vengono approssimate e trattate come statiche ma bisogna sempre ricordare che nella realtà una proteina è una struttura altamente dinamica e proprio in virtù della sua natura dinamica deve le sue attività biologiche e reattive. La struttura in analisi rappresenta quindi "un'istantanea" della proteina bloccata in una

particolare conformazione che la rende sufficientemente stabile da permetterne la cristallizzazione e l'analisi strutturale tramite la diffrazione ai raggi X.

I passaggi fondamentali, nel *rational drug design*, sono (Leach 2001):

- investigare il meccanismo di riconoscimento molecolare (I);
- calcolare l'E_{LIBERA} di associazione per conoscere la stabilità del complesso (II);
- visualizzare la posa molecolare dell'interazione tra ligando e *target* (III);
- modificare il complesso di interazione *in situ* per ottenere $E_{DI\ BINDING}$ minore e quindi maggiore affinità (IV);
- valutare proprietà di tossicità e ADME del ligando (V).

Ricapitolando, tra i principali limiti della tecnica, abbiamo che le interazioni tra il ligando e il recettore sono solo stimate e non riprodotte fedelmente, inoltre gli amminoacidi che compongono il recettore proteico sono considerati statici e non capaci di muoversi come invece avviene nella realtà, in ultimo il solvente in AutoDock è considerato solo in maniera implicita attraverso una *costante dielettrica* del mezzo, ciò vuol dire che le molecole d'acqua, ad esempio, non sono trattate esplicitamente nella simulazione e quindi non si vanno a simulare minuziosamente i legami idrogeno, ponti salini, etc. presenti in natura.

3.3.1 AutoDock

AutoDock è uno dei programmi di docking più utilizzato; è sviluppato e distribuito gratuitamente da "The Scripps Research Institute" (https://autodock.scripps.edu/).

Il programma necessita di due *input*: la struttura del recettore e quella del ligando. Il recettore è considerato rigido o semi-flessibile mentre il ligando flessibile: il numero di gradi di libertà torsionali vanno da zero, molecola rigida senza punti di rotazione (ad esempio una molecola planare), fino al numero massimo consentito dalla struttura stessa (G. M. Morris 2001).

Le *scoring functions* danno una stima dell'affinità e sono usate per calcolare le energie di interazione tra ligando e recettore. Il programma, variando *esclusivamente* la conformazione del ligando mediante il metodo MM/MC stocastico, cerca di trovare l'affinità massima tra le due molecole ancorate. La *funzione di score* viene calcolata con l'energia potenziale di AMBER, campo di forza di tipo I, e tiene conto della complementarità sterica, delle interazioni idrofobiche, dell'energia di non legame e dell'energia di desolvatazione. Per questi motivi essa è particolarmente accurata rispetto ad altri programmi di docking in quanto sono omessi solo i termini di stretching e di bending che poco influiscono sul calcolo totale (G. M. Morris 2008).

Come accennato pocanzi, le conformazioni del ligando vengono generate con il metodo Monte Carlo, i movimenti roto-traslazionali e rotazionali degli angoli torsionali del ligando sono effettuati insieme al docking (tecnica di *simulated annealing*). Inoltre, attraverso l'algoritmo Metropolis Boltzmann-Jump vengono eliminati tutti i minimi locali sull'ipersuperficie che potrebbero interferire con il risultato: solo il *minimo assoluto*, ovvero la conformazione più stabile, viene conservata (G. M. Morris 2001).

Se immaginiamo il nostro ligando che interagisce in punti diversi del nostro recettore si va a valutare l'energia del primo complesso, poi ne viene generato un altro che ha un'energia differente e si confronta la ΔE e così di seguito per un numero variabile di cicli per migliorare man mano il risultato. Inoltre, con questo meccanismo, vengono generati nuovi orientamenti diversi dal primo che, a seconda della loro bontà, vengono mantenuti o scartati. Stiamo descrivendo perciò un *metodo stocastico* durante il quale la molecola viene sottoposta a cambiamenti casuali che verranno successivamente mantenuti o eliminati in base ad una funzione di probabilità (G. M. Morris 2008).

AutoDock prevede anche la presenza di acqua nell'ambiente in cui è immersa la proteina assegnando dei coefficienti di solvatazione ad ogni tipo atomico presente e considerando l'effetto idrofobico nella *funzione di scoring*. In questo modo si tiene conto del fatto che la molecola può potenzialmente legarsi

all'acqua formando legami a idrogeno. Le molecole d'acqua sono competitive rispetto il recettore e ciò influisce anche sulla posizione e la posa di minimo assunta dal ligando (G. M. Morris 2008).

Per il processo di docking bisogna preparare le coordinate del ligando e del recettore come file PDB distinti. Le coordinate del ligando e del recettore vengono poi aperte con AutoDock e salvate in formato .pdbqt (dove sono descritte anche le cariche) (G. M. Morris 2001).

La *Grid Box* è una griglia dove inseriamo l'area del sito attivo in cui verrà predetta l'interazione del ligando nei confronti del recettore e dove esso potrà stabilire i legami con la macromolecola. Punto di forza del software è quello di creare un reticolo dove si trovano degli "atomi di prova" e si valutano le energie d'interazione con gli atomi del recettore presenti entro un certo raggio (detto di *cutoff*) per evitare di calcolare contributi poco significativi. Si costruisce così una mappa di affinità degli atomi del ligando, posti ai vertici del reticolo, con tutti gli atomi presenti nella griglia (G. M. Morris 2001).

Viene anche costruita, in maniera analoga, una griglia di potenziale elettrostatico usando una carica unitaria puntiforme come carica di prova. Il potenziale elettrostatico viene valutato separatamente per aumentare la

precisione del calcolo delle cariche atomiche presenti nel substrato (G. M. Morris 2001).

Il grande vantaggio della Grid Box è quindi nella riduzione del tempo di calcolo dell'energia, proporzionale al numero di atomi del ligando ma indipendente da quelli della macromolecola. Impostare una griglia dove il contenuto energetico degli atomi è già calcolato riduce sensibilmente il numero di calcoli da fare, si deve solo trovare l'orientamento migliore nel quale disporre il ligando (G. M. Morris 2008).

Per poter effettuare il docking è necessario poi creare un set di parametri ad hoc per il docking (file .dpf), questo contiene informazioni su dove reperire le coordinate della molecola, i parametri della stessa e altre informazioni importanti come il numero di corse da effettuare, scegliere il numero di cicli appropriato è importante perché influisce sull'accuratezza e sui tempi del calcolo (G. M. Morris 2001).

L'algoritmo genetico, utilizzato frequentemente per tale processo di docking, che genera i nuovi orientamenti e pose del ligando, è basato su leggi e meccanismi della genetica e dell'evoluzione biologica per calcolare la migliore conformazione del ligando che interagisce nel sito catalitico (G. M. Morris 2001).

Il miglior disponibile in AutoDock è il “Lamarchian Genetic Algoritm” dove fattori esterni e ambientali possono influenzare il fenotipo che è capace a sua volta di modificare il genotipo in ottemperanza alla legge dell’ereditarietà dei caratteri acquisiti (Lamarck, 1809).

Nel genotipo sono codificate le informazioni del ligando come la traslazione, l’orientamento, la conformazione e i gradi di libertà, questi parametri costituisco i geni che vengono trasmessi alla progenie. L’importanza relativa di geni e cromosomi è determinata dalla *scoring function* (G. M. Morris 2001).

Il fenotipo contiene le coordinate atomiche e la *fitness* (la somma delle energie di interazione e intermolecolare tra ligando e recettore e quella intramolecolare del ligando).

Le mutazioni, il *crossing over* e le migrazioni sono operatori genetici che introducono la variabilità nella *generazione filiale* modificando il valore di un gene, spostando gruppi di geni da un cromosoma parentale ad un altro o spostando singoli geni da una sottopopolazione ad un’altra.

L’algoritmo crea inizialmente una popolazione di individui *randomica* dove coppie di individui prese casualmente diventano partner di un processo “simil-meiotico” in cui si formano nuovi individui che ereditano i geni da entrambi i genitori. In base alla fitness si selezionano gli individui che si riprodurranno:

quelli che hanno energia migliore (più negativa) avranno prole più numerosa in proporzione allo scarto energetico. Le soluzioni di docking più adatte all'ambiente si riproducono, quelle meno adatte si estinguono e alcuni genotipi subiranno mutazioni casuali in maniera analoga a come compaiono e si affermano le mutazioni in natura.

L'energia libera di docking è la somma di energia di legame, che comprende l'energia d'interazione intermolecolare e l'energia torsionale, con l'energia di interazione intramolecolare (la variazione di energia dalla forma libera a quella legata del ligando) (G. M. Morris 2008).

È un metodo adattativo in cui la potenza di calcolo viene usata per cercare risultati via via migliori e non è quindi sprecata per calcolare conformazioni improbabili diverse da quelle a cui sta tendendo la ricerca.

I risultati del docking sono in formato .dlg e le conformazioni trovate si dispongono in cluster nel grafico di visualizzazione dei risultati: l'appartenenza ad un cluster è dettata dall'energia di legame e dalla posa delle conformazioni trovate (G. M. Morris 2001).

Con AutoDock possono poi essere analizzate le varie pose e le interazioni dei ligandi *dockati* con gli amminoacidi della molecola (G. M. Morris 2001).

3.4 High-Throughput Virtual Screening

Tecnica computazionale usata nell'identificazione di potenziali composti attivi (*leads*) attraverso la ricerca nelle librerie di piccole molecole per identificare le strutture che hanno migliori probabilità di legarsi ad un *target*, si va quindi a testare l'affinità di un numero elevato di composti nei confronti di un determinato bersaglio. È necessario quindi disporre di un database che può essere migliorato dall'operatore, come in questo lavoro di tesi dove i composti sono stati disegnati *de novo*, o scaricato da database online (Gimeno 2019).

Esistono due metodi per fare virtual screening. Nel primo la struttura di un recettore è sconosciuta e ci basiamo sul ligando andando a creare un modello *farmacoforico* o sfruttando le informazioni collettive di molti ligandi diversi che si vanno a legare al recettore (*ligand-based virtual screening*) oppure ci basiamo sul recettore testando l'affinità dei diversi possibili ligandi con delle *funzioni di score* (Gimeno 2019).

3.4.1 AutoDock Vina

In maniera omologa ad AutoDock, Vina richiede il precalcolo di una mappa di potenziale che migliora la velocità e l'efficienza di calcolo del programma. La mappa è una griglia calcolata dal modulo *AutoGrid* costituita da un reticolo tridimensionale di punti regolarmente distanziati e centrata sulla regione d'interesse della macromolecola studiata. Ogni punto all'interno della mappa della griglia memorizza l'energia potenziale di un atomo "sonda" o gruppo funzionale derivante dal suo passaggio in prossimità di tutti gli atomi della macromolecola (Vieira 2019).

Vina utilizza sempre il metodo Monte Carlo per la generazione casuale e il campionamento delle pose assunte da ogni composto nel sito di interesse. L'energia libera di legame di Gibbs è valutata per ogni posa campionata mediante l'utilizzo di una *funzione di score* basata su *X-score*. La funzione di score di Vina calcola l'affinità, o *fitness*, del legame proteina-ligando sommando i contributi di più termini individuali. L'energia di legame è calcolata come la somma delle interazioni per ogni coppia di atomi, basata sulla loro distanza (Vieira 2019).

Dopo la preparazione del database e del target viene effettuato il docking usando delle funzioni di score più veloci di quelle di AutoDock. In seguito, si

valuta l'affinità dei vari composti selezionando quelli più affini e testandoli *in vitro* (Vieira 2019).

Si valutano poi la tossicità del ligando, il *Lipinski's rule of five* (una stima della biodisponibilità orale del farmaco) e l'ADME (*Absorption Distribution Metabolisation Excretion*) (Benet 2016).

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Strutture della pompa d'efflusso AcrB trovate: struttura scelta e collezione dei ligandi d'interesse co-cristallizzati presenti nelle altre.

Per procedere allo studio della struttura tridimensionale, e dei nuovi possibili inibitori, della pompa AcrB come primo passaggio è stata necessaria una ricerca bibliografica introduttiva sullo stato dell'arte della struttura e il funzionamento della pompa d'efflusso partendo dalla ricerca delle strutture cristallografiche risolte presenti in banca dati PDB (https://www.rcsb.org/), da sole o con eventuali inibitori co-cristallizzati e delle ricerche già pubblicate.

Ho collezionato 31 strutture cristallografiche: per ognuna ho raccolto le informazioni generali (dati sperimentali, anno di risoluzione della struttura, ricerca annessa, grafico dell'analisi PROCHECK, etc.)

Di seguito troviamo la tabella riassuntiva con riportate le principali informazioni che ho confrontato per scegliere la struttura migliore da investigare. Evidenziata in verde la struttura scelta e in celeste le strutture dalle quali ho isolato i ligandi co-cristallizzati.

PDBcode	Anno	Completa	Risoluzione	Ligandi	PROCHECK
1IWG	2002	NO	3.50 Å	-	CATTIVO
2DHH	2006	SI	2.80 Å	-	PESSIMO
2GIF	2006	SI	2.90 Å	FLC	DECENTE
2HRT	2006	SI	3.00 Å	FLC	DECENTE
2IW6	2006	NO	3.10 Å	-	PESSIMO
2J8S	2006	SI	2.54 Å	LMU + LMT	DECENTE
3W9H	2013	SI	3.05 Å	D13-9001	PESSIMO
4DX5	2012	SI	1.90 Å	MIY	BUONO
4DX6	2016	SI	2.90 Å	LMT	BUONO
4DX7	2012	SI	2.25 Å	DM2	BUONO
4K7Q	2013	NO	3.50 Å	LINEZOLID	DECENTE
4U8V	2014	SI	2.30 Å	LMT + MIY	BUONO
4U8Y	2014	SI	2.10 Å	LMT + MIY	DECENTE
4U95	2014	SI	2.00 Å	LMT + MIY	BUONO
4U96	2015	SI	2.40 Å	LMT	DECENTE
4ZLJ	2015	NO	3.26 Å	-	DECENTE
4ZIT	2015	SI	3.30 Å	LMT + NI	CATTIVO
5EN5	2015	NO	2.30 Å	-	OTTIMO
5ENO	2015	NO	2.20 Å	MBX2319	OTTIMO
5ENP	2015	NO	1.90 Å	MBX2931	OTTIMO
5ENQ	2015	NO	1.80 Å	MBX3132	OTTIMO
5ENR	2015	NO	2.30 Å	MBX3135	OTTIMO
5ENS	2015	NO	2.80 Å	RODAMINA	OTTIMO
5JMN	2016	SI	2.50 Å	ACIDO FUSIDICO	BUONO
5O66	2017	SI	5.90 Å (ME)	-	BUONO
5VS5	2017	SI	6.50 Å (ME)	MSE	DECENTE
6CSX	2018	SI	3.00 Å (ME)	PTY + D12	BUONO
6Q4N	2018	SI	2.80 Å	ACIDO FUSIDICO	BUONO
6Q4O	2018	SI	2.80 Å	ACIDO FUSIDICO	BUONO
6Q4P	2018	SI	2.80 Å	ACIDO FUSIDICO	BUONO

Tabella 4.1. *Tabella riassuntiva con riportate le informazioni principali che ho valutato per scegliere la struttura di partenza migliore da investigare. Evidenziata in verde la struttura scelta e in celeste quelle da cui ho isolato i ligandi co-cristallizzati.*

La struttura scelta, che ho poi adoperato in tutte le consegne svolte durante il lavoro di tesi, è riportata con il seguente nome sul PDB: "*Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are sep8arated by a switch-loop*"; con codice identificativo PDB (*PDB code*): 4DX5 (https://www.rcsb.org/structure/4DX5).

La proteina è stata risolta con la tecnica della "cristallografia a raggi X" avente risoluzione di 1.90 Å, quindi abbastanza elevata, pubblicata il 05/02/2012. È l'omotrimero completo del trasportatore di membrana *Acriflavine resistence protein B* legato a diverse molecole utili a risolverne la struttura e con la minociclina (Eicher 2012).

L'analisi PROCHECK, disponibile sulla banca dati PDBsum, è buona in quanto solo poche combinazioni degli angoli diedri, degli amminoacidi che compongo la struttura, ricadono in zone termodinamicamente non favorite del *Ramachandran Plot*.

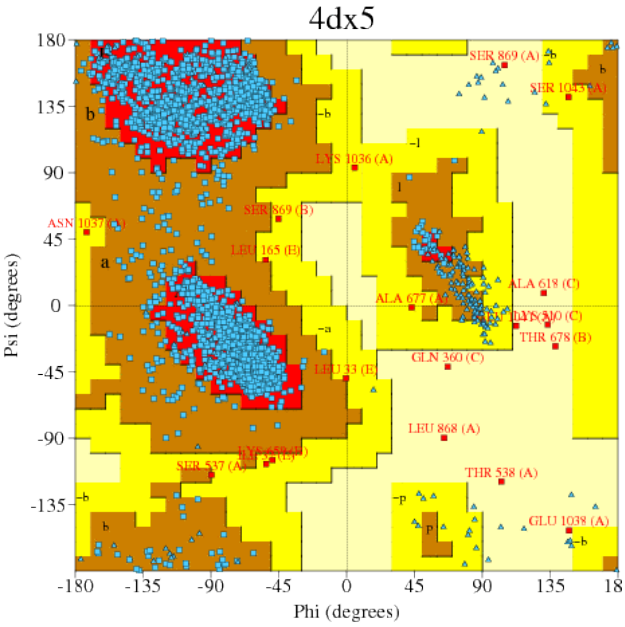


Figura 4.1. *Analisi PROCHECH (da PDBsum).*

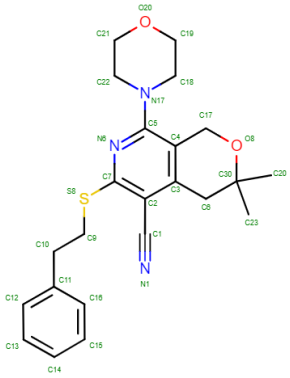
La struttura è abbastanza presente in bibliografia essendo stata usata, e citata, in diverse pubblicazioni recenti (Atzori 2020) (R. M. Johnson 2020) (Reading 2020) (Zgurskaya 2021).

La struttura cristallizzata corrisponde alla *forma attiva* della pompa d'efflusso in quanto le tre subunità che formano AcrB sono in *conformazione asimmetrica* (LTO) in accordo al meccanismo di *rotazione concertata*; la subunità A è in conformazione *Loose*, quella B in *Tight* e la C in *Open* (Eicher 2012).

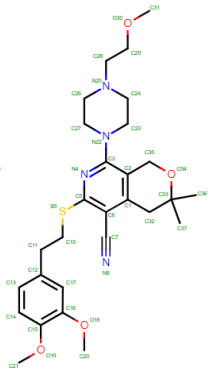
La subunità scelta in ogni punto della tesi varia in base alla domanda biologica posta in quell'esperimento per cercare di lavorare sempre con la più consona al quesito posto.

Gli otto ligandi co-cristallizzati, che sono stati isolati per il successivo esperimento, sono i seguenti: MBX2319 (da 5ENO), MBX2931 (da 5ENP), MBX3132 (da 5ENQ), MBX3135 (da 5ENR), RHQ (da 5ENS), MIY (da 4DX5), DM2 (da 4DX7) e D13-9001 (da 3W9H). Segue una breve descrizione di ognuno; tutti si dispongono all'interno della *deep binding pocket*.

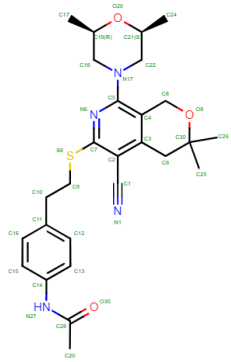
La serie MBX è composta da promettenti inibitori appartenenti alla classe delle piranopirimidine.



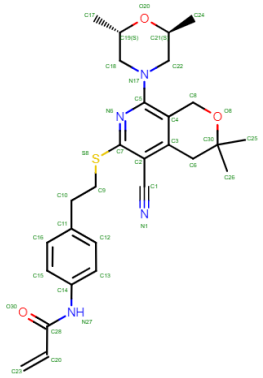
MBX 2319



MBX2931

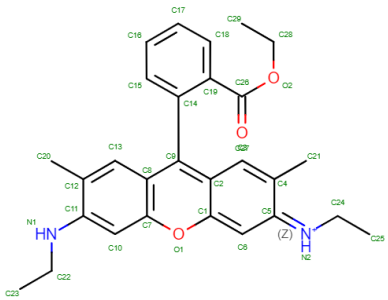


MBX3132



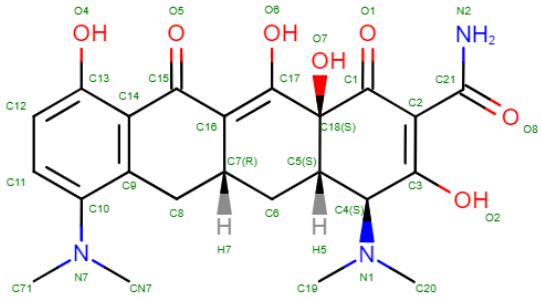
MBX3135

La rodamina-6G (R6G) è un colorante fluorescente.



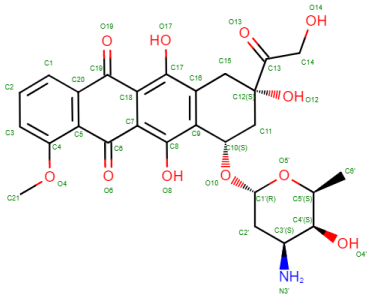
RHQ

La minociclina è una tetraciclina.



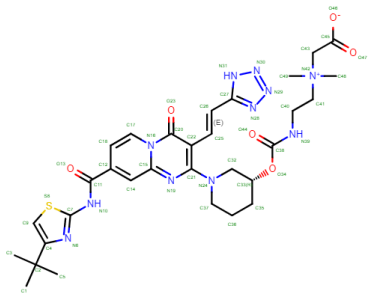
MIN

La doxorubicina (DM2), nota anche come adriamicina, viene usata come farmaco ad azione antitumorale, antibatterica e immunosoppressiva; intercala il DNA bloccando la trascrizione.



DM2

D13-9001 è un'altra piranopirimidina attiva contro la pompa di efflusso AcrB.



D13-9001

4.2 Riproduzione *in silico* dei dati sperimentali e mappatura della *deep binding pocket*

Una volta scelta la struttura di AcrB reputata migliore per i lavori di tesi e collezionati i ligandi isolati co-cristallizzati (cinque inibitori, un antibiotico, un colorante e un altro farmaco) ho proceduto a replicare *in silico* i dati sperimentali. Così facendo ho anche testato la validità del protocollo di docking, utilizzato anche nelle successive prove sperimentali della tesi.

Ho lavorato isolando la subunità B con conformazione Tight perché, dalle ricerche introduttive sulla struttura della pompa d'efflusso, in questa conformazione il sito di legame *deep binding pocket* (vedi **Figura 1.4** oppure **Figura 4.16**), oggetto della mia analisi, è più voluminoso (Reading 2020).

Il protocollo sperimentale ha previsto un *blind docking* su tutto il Dominio Porter (vedi **Figura 1.4**) seguito da un *focused docking* centrato sulla posa migliore e da un *focused docking* indipendente da quelli precedenti come controllo positivo (utilizzando un *Grid Box* predefinita ottimizzata dal *blind docking* di MBX2319, il ligando che meglio si disponeva all'interno della tasca). Per eseguire i *docking* è stato usato il programma AutoDock (Eicher 2012).

Le locuzioni *blind* e *focused docking* si riferiscono all'area di interazione investigata: inizialmente viene sottoposto al protocollo di *docking* l'intero Dominio Porter e perciò il *docking* viene definito *blind* (dall'inglese *cieco*) in quanto ricerca su un volume ampio tutti i possibili siti di aggancio del ligando, mentre, una volta ottenuti i primi risultati, la *Grid Box* viene centrata sulle nuove pose del ligando trovate e giudicate più promettenti, includendo perciò un'area di ricerca minore e aumentando la precisione del calcolo (*focused*, dall'inglese "mirato" o "focalizzato").

A questo punto, sempre usando il programma AutoDock, si sono analizzate le pose migliori, le loro energie di interazione, costanti di inibizione e i residui interagenti. Le pose trovate sono state poi confrontate rispetto quelle originali.

A pagina successiva troviamo la tabella con i risultati.

Ligando	Cluster	Popolazione ($^{x}/_{100}$)	E_B ($^{kcal}/_{mol}$)	kI	Residui
MBX2319	7.2	64	-8.89	303.28 nM	9
MBX2931	3	46	-9.17	190.7 nM	12
MBX2931[1]	5.1	51	-9.21	176.09 nM	11
MBX2931[2]	2.2	47	-9.09	217.96 nM	12
MBX3132	4	68	-10.30	28.16 nM	12
MBX3132	4.1	62	-10.36	25.57 nM	10
MBX3135	3	62	-10.42	23.21 nM	11
MBX3135	3.1	48	-10.58	17.46 nM	12
RHQ	2	85	-9.08	221.27 nM	10
RHQ	1.1.2	77	-9.09	215.56 nM	10
MIY	1	36	-7.46	3.41 uM	9
MIY	16.1	50	-7.58	2.79 uM	10
DM2	1	40	-8.10	1.15 uM	12
DM2	2.1	38	-9.03	242.43 nM	10
D13-9001	1	38	-10.49	20.38 nM	15
D13-9001	1.2	23	-10.51	19.61 nM	15

Tabella 4.2. *In verde i risultati dei focused docking con la Grid Box predefinita ottimizzata con MBX2319. In bianco quelli del focused docking eseguito dopo il blind docking sull'intero Dominio Porter.*

Ligando	F136	V139	Q151	Q176	L177	F178	G179	I277	A279	P326	Y327	M573	F610	V612	F615	F617	I626	F628
MBX2319																		
MBX2931																		
MBX2931[1]																		
MBX2931[2]																		
MBX3132																		
MBX3132																		
MBX3135																		
MBX3135																		
RHQ																		
RHQ																		
MIY																		
MIY																		
DM2																		
DM2																		
P9D																		
P9D																		
Risultato																		

Tabella 4.3. *Mappatura dei residui della deep binding pocket che interagiscono coi ligandi.*

In rosso sono evidenziati gli amminoacidi fondamentali nell'interazione ovvero quelli che caratterizzano la tasca.

I residui trovati nella mappatura del *deep binding pocket* sono dodici tra cui sei fenilalanine, due valine, un'isoleucina, un'alanina, una tirosina e una metionina. Escludendo la tirosina (amminoacido aromatico polare), sono tutti amminoacidi apolari e sono presenti ben sei fenilalanine che, oltre ad essere idrofobiche, sono anche aromatiche.

Le fenilalanine e gli altri amminoacidi apolari sono sempre presenti e probabilmente originano le caratteristiche chimico-fisiche tipiche della tasca. La *deep binding pocket* è infatti ben conosciuta per la sua caratteristica idrofobicità, *hydrophobic trap* in letteratura (T. J. Opperman 2015), a cui è dovuta l'associazione, il trasporto e l'espulsione dei substrati. Il dato quindi, in accordo con la letteratura scientifica, indica che il protocollo di *docking* è stato eseguito correttamente.

Le pose dei ligandi riprodotte *in silico* sono molto fedeli a quelle cristallizzate indicando nuovamente che il protocollo di *docking* è valido.

4.3 Docking della berberina e dei suoi derivati nella deep binding pocket

Una volta mappata la *deep binding pocket* ho proceduto a valutare il comportamento della berberina, e dei suoi tre derivati, nella tasca.

Come già descritto nell'introduzione, queste molecole si sono rilevate molto efficaci nell'inibizione della pompa di efflusso MexY, trasportatore proteico omologo ad AcrB presente in *Pseudomonas aeruginosa* (Giorgini 2021) (Laudadio 2019).

Il protocollo sperimentale ha previsto un *focused docking* per la berberina e ognuno dei suoi tre derivati all'interno del sito mappato; il *focused docking* è stato ripetuto in triplice copia perché gli algoritmi di ricerca lavorano in maniera stocastica e, trattandosi di uno studio *de novo* e non di una replica di dati sperimentali come nell'esperimento precedente, sì facendo migliora l'affidabilità del risultato. Come *controllo positivo* ho eseguito un *blind docking* indipendente per ognuna di queste quattro molecole all'interno dell'intero Dominio Porter: l'obiettivo era quello di osservare se le pose di queste molecole, libere di disporsi nell'intero dominio, andassero a posizionarsi anche nella *deep binding pocket*.

Per entrambi i procedimenti si sono andate a valutare l'energia di legame, la costante di inibizione, gli amminoacidi interagenti e si sono sovrapposte le pose trovate *in silico* con quella della MBX2319 (perché è il ligando

co-cristallizzato che meglio si disponeva all'interno della *deep binding pocket*). In ultimo, si è andata a confrontare anche la miglior posa del *focused docking* con quella trovata col *blind docking* di controllo.

Come nell'esperimento precedente è stata usata la subunità B di 4DX5 perché, come già illustrato, in questa conformazione la tasca di legame *deep binding pocket* è più voluminosa (Reading 2020).

La *Grid Box* utilizzata è quella ottimizzata dalla riproduzione delle pose dei ligandi cristallizzati.

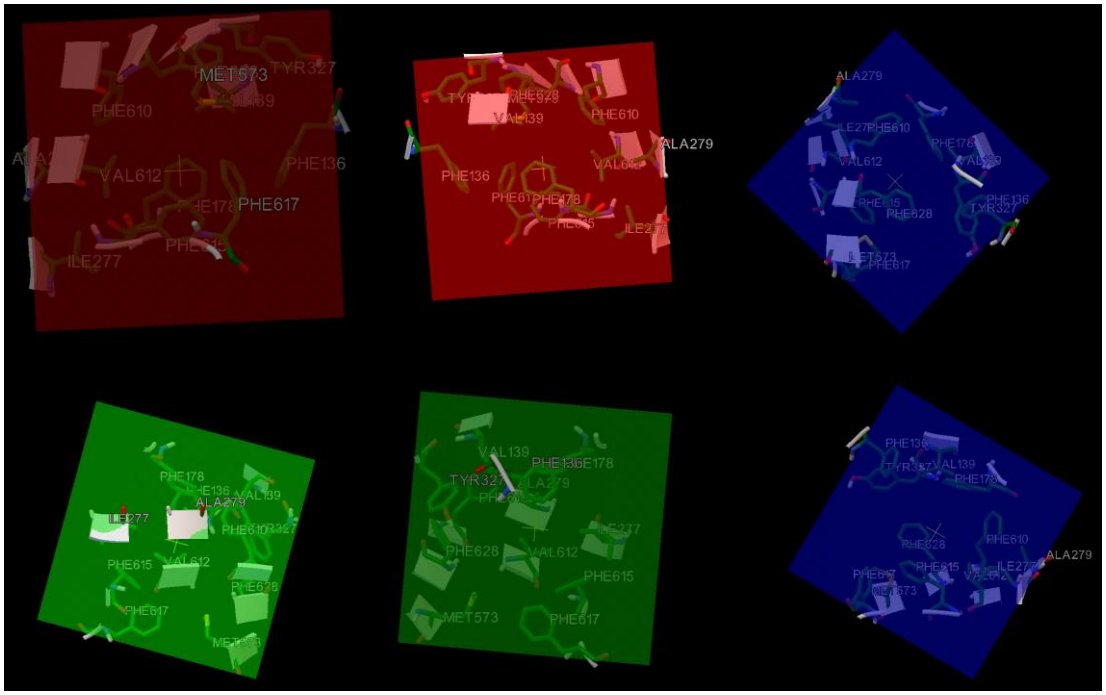


Figura 4.2 Nell'immagine possiamo osservare, da tutte le angolazioni, i residui mappati che sono tutti inclusi nella Grid Box usata per il focused docking.

Seguono i risultati per ognuna delle quattro molecole.

4.3.1 Berberina

Docking	Cluster	Popolazione ($^{x}/_{100}$)	E_B ($^{kcal}/_{mol}$)	kI	N° residui interagenti
Focused I	1	99	-8.61	488.32 nM	8
" II	1	99	-8.61	488.24 nM	8
" III	1	99	-8.61	487.8 nM	8
Blind	1	60	-8.58	517.25 nM	8

Tabella 4.4. *Tabella con i risultati dei docking per la berberina. In verde evidenziato il miglior risultato.*

I risultati sono tutti simili e molto buoni. Naturalmente, nel *blind docking* all'interno del Dominio Porter, sono state trovate anche pose in altre posizioni del recettore (gli altri possibili siti di inibizione verranno indagati successivamente nel mio lavoro di tesi) ma l'esperimento di controllo ha comunque confermato l'esito positivo dell'esperimento.

Ligando	F136	V139	F178	I277	A279	Y327	M573	F610	V612	F615	F617	F628
Mappati												
Focused												
Blind												

Tabella 4.5. *Residui interagenti confrontati con quelli mappati. Per il focused docking è presente un'unica riga perché medesimo risultato in tutte le repliche.*

Quasi tutti i residui mappati precedentemente, che sono quelli più importanti nell'interazione con i ligandi all'interno della *deep binding pocket*, sono coinvolti nel legame. Non sono stati trovati altri residui.

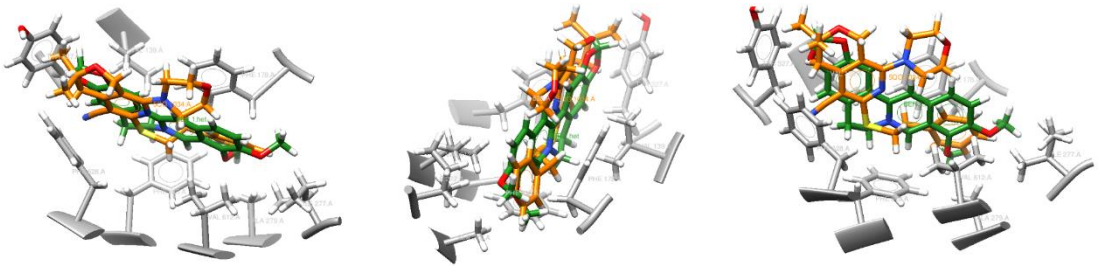


Figura 4.6. *Sovrapposizione della berberina, in verde, con MBX2319, in arancione.*
Sono visibili esclusivamente i residui della macromolecola che interagiscono con la berberina (riportati nella tabella precedente).

La berberina si dispone molto bene all'interno della tasca di legame.

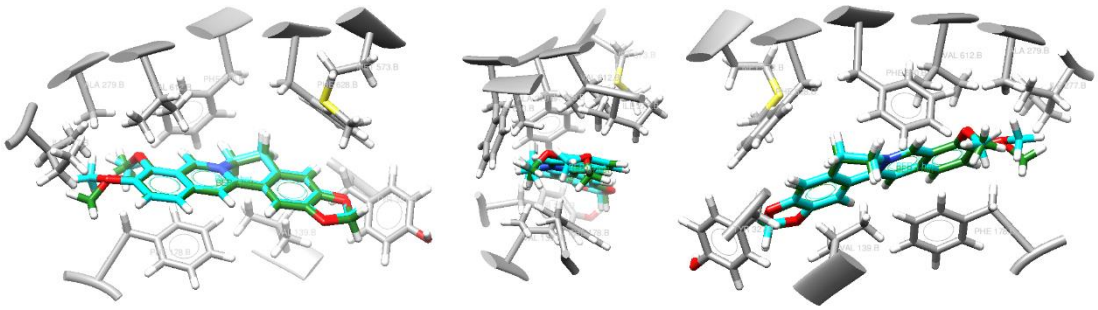


Figura 4.7. *Confronto tra la posa migliore del focused docking colorata in verde (era evidenziata nello stesso colore nella tabella dei risultati) e quella del blind docking in celeste.*

Sia i *focused docking* sia il *blind docking,* usato come *controllo positivo*, hanno come esito lo stesso risultato aumentando l'affidabilità dello stesso e confermando la correttezza dell'esperimento.

4.3.2 13-(4-trifluoromethylbenzyl)-berberine (p-CF_3)

Docking	Cluster	Popolazione ($^{x}/_{100}$)	E_B ($^{kcal}/_{mol}$)	kI	N° residui interagenti
Focused I	2	26	-9.16	193.01 nM	8
" II	3	21	-9.16	192.42 nM	9
" III	2	22	-9.15	195.88 nM	9
Blind	7	26	-9.06	227.24 nM	8

Tabella 4.8. *Risultati dei docking per p-CF_3-berberine.*
In verde evidenziato il miglior risultato.

In tutte le repliche sono stati trovati altri due *clusters* con risultato molto simile a quelli riportati ovvero con analoghi valori, pose e numerosità rispetto quelli descritti. I *clusters*, sebbene discretamente popolati, mostrano risultati molto interessanti. Il *blind* conferma il buon esito del saggio di *docking*.

Docking	F136	V139	F178	I277	A279	P326	Y327	M573	F610	V612	F615	F617	F628
Mappati													
Focused I													
" II													
" III													
Blind													

Tabella 4.9. *Residui interagenti confrontati con quelli mappati.*

I residui mappati partecipano quasi tutti al legame. Nei *focused* è stata rilevata anche l'interazione con una prolina.

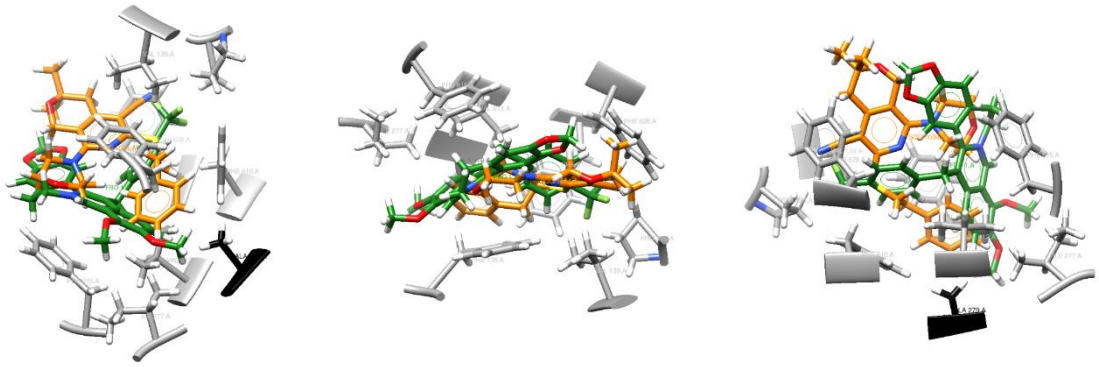


Figura 4.2. *Sovrapposizione di p-CF_3-berberine, in verde, con MBX2319, in arancione. Sono visibili solo i residui della tasca che interagiscono con la molecola (riportati nella tabella precedente). In nero abbiamo l'alanina in posizione 279 ed è così evidenziata perché non è stata trovata in una replica del focused docking.*

Anche la 13-(4-trifluoromethylbenzyl)-berberine (p-CF3) si dispone molto bene nella *deep binding pocket*.

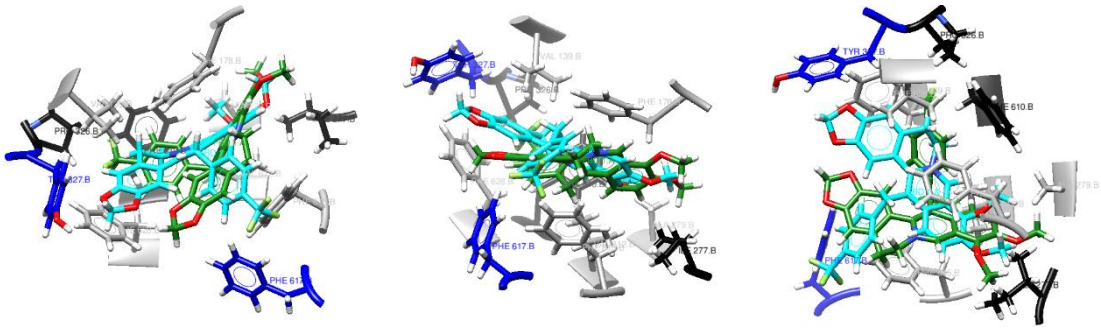


Figura 4.3. *Confronto tra la posa migliore del focused docking colorata in verde (com'era evidenziata nella tabella dei risultati) e quella del blind docking in celeste. I residui colorati in nero indicano quelli trovati solo nel focused docking mentre in blu abbiamo quelli esclusivi del blind docking.*

I *focused docking* e il *blind docking* mostrano risultati simili di buona qualità.

4.3.3 13-(2-methylbenzyl)-berberine

Docking	Cluster	Popolazione ($^{x}/_{100}$)	E_B ($^{kcal}/_{mol}$)	kI	N° residui interagenti
Focused I	1	98	-9.96	49.79 nM	11
" II	1	93	-9.96	49.92 nM	11
" III	1	89	-9.96	49.84 nM	10
Blind	3	60	-9.82	63.44 nM	10

Tabella 4.10. *Risultati dei docking per o-CH_3-berberine.*
In verde evidenziato il miglior risultato.

I risultati sono veramente buoni e concordi tra loro; il *blind docking*, anche in questo caso, valida l'esperimento.

Docking	F136	V139	Q151	F178	G179	I277	A279	Y327	M573	F610	V612	F615	F617	I626	F628
Mappati															
Focused I															
" II															
" III															
Blind 3															

Tabella 4.11. *Residui interagenti confrontati con quelli mappati.*

Oltre a quasi tutti i residui mappati che partecipano quasi tutti al legame, troviamo anche una glicina e un'isoleucina in tutti i saggi e, in due repliche su tre del *focused docking*, è presente anche una glutammina.

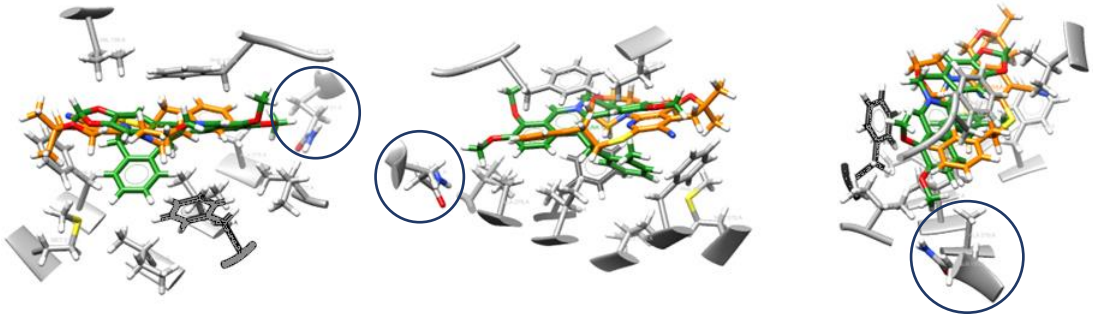


Figura 4.4. *Sovrapposizione di o-CH_3-berberine, in verde, con MBX2319, in arancione. Sono visibili i residui della deep binding pocket che interagiscono con il composto (riportati nella tabella precedente). Cerchiata in blu troviamo la glutammina in posizione 151 ad indicare che è stata trovata in due delle repliche del focused docking e non in tutte tre.*

Anche la 13-(2-methylbenzyl)-berberine si dispone bene all'interno della tasca.

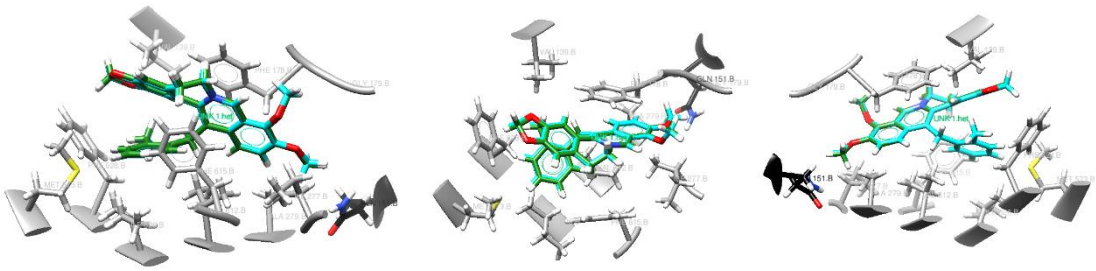


Figura 4.5. *Confronto tra la posa migliore del focused docking colorata in verde (come nella tabella dei risultati) e quella del blind docking in celeste.*
La glutammina in posizione 151 è colorata in nero perché è stata trovata solo in due focused docking.

Anche in questo caso c'è un'ottima corrispondenza nei risultati tra *focused* e *blind docking*. In entrambi i protocolli l'orto-derivato della berberina si dispone molto bene nella *deep binding* pocket.

4.3.4 13-(4-methylbenzyl)-berberine

Docking	Cluster	Popolazione ($^{x}/_{100}$)	E_B ($^{kcal}/_{mol}$)	kI	N° residui interagenti
Focused I	2	43	-9.68	80.36 nM	10
" II	3	36	-9.67	81.01 nM	10
" III	1	44	-9.69	78.9 nM	10
Blind	4	23	-9.49	110.27 nM	9

Tabella 4.12. *Risultati dei docking per p-CH_3-berberine.*
In verde evidenziato il miglior risultato.

In tutte le repliche è stato trovato un altro cluster con risultato molto simile a quello riportato. I risultati dei *focused* sono buoni e concordi a quello del *blind*.

Docking	F136	V139	Q151	F178	I277	A279	P326	Y327	M573	F610	V612	F615	F617	F628
Mappati														
Focused														
Blind														

Tabella 4.13. *Residui interagenti confrontati con quelli mappati. Per il focused docking è presente un'unica riga perché medesimo risultato in tutte le repliche.*

Anche in quest'ultima molecola quasi tutti i residui caratterizzati della *deep binding pocket* partecipano al legame; sono state rilevate anche una glutammina, la stessa presente nell'interazione di o-CH_3-berberine, e una prolina, la stessa che partecipava al legame con 4-FBD-berberine.

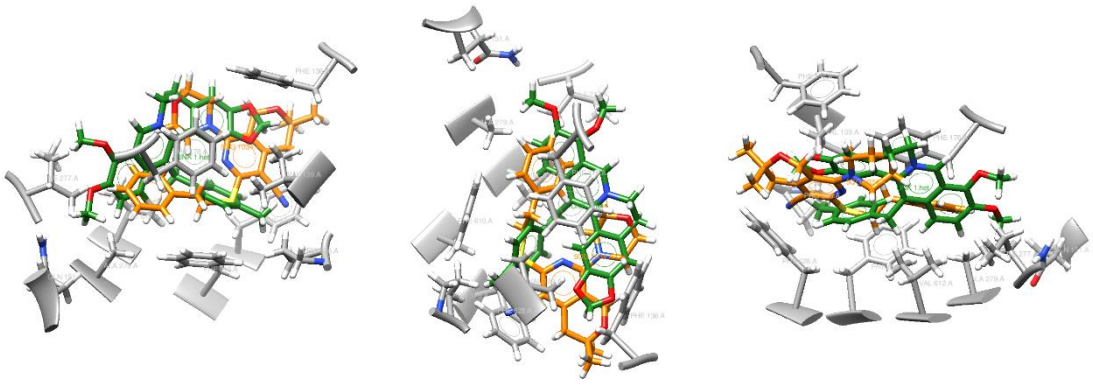


Figura 4.6. *Sovrapposizione di p-CH_3-berberine, in verde, con MBX2319, in arancione. Visibili, come in precedenza, solo i residui della tasca con cui va ad interagire (riportati nella tabella precedente).*

Anche la 13-(4-methylbenzyl)-berberine, come gli altri composti, si dispone molto bene all'interno della tasca; rispetto a MBX2319 è leggermente traslata.

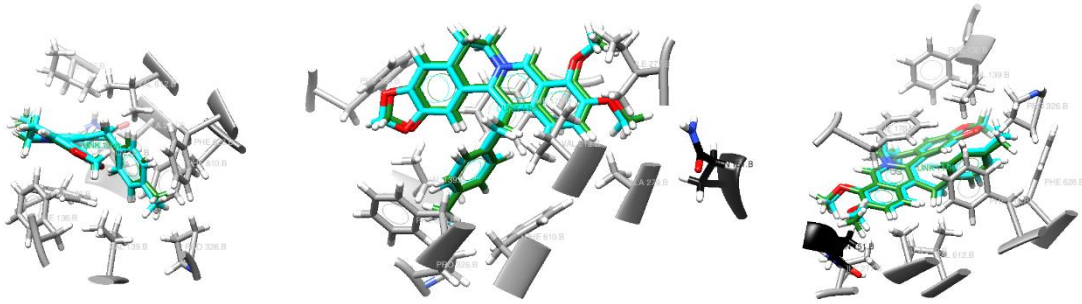


Figura 4.7. *Confronto tra la posa migliore del focused docking colorata in verde (come nella tabella dei risultati) e quella del blind docking in celeste. La glutammina in posizione 151 è l'unico residuo trovato coi focused docking e non con il blind docking: perciò è colorata in nero.*

La sovrapposizione tra le molecole con i due differenti protocolli è praticamente perfetta avvalorando la robustezza del risultato.

4.3.5 Discussione

I saggi di *docking* hanno dato risultati riproducibili e confrontabili con i *blind docking* che, oltre a confermare il buon esito di tutti gli esperimenti, hanno trovato anche altri possibili siti di inibizione che quindi sono stati considerati nel proseguo della tesi.

La berberina e i suoi derivati mostrano ottime proprietà di legame con la *deep binding pocket* suggerendo un possibile meccanismo di inibizione della pompa d'efflusso AcrB in questa tasca di legame. Tale risultato si contrappone al meccanismo di inibizione della berberina in MexY di *P. aeruginosa* in cui il sito di binding è localizzato sotto alla DBP e riportato come *sito di inibizione* (vedi **Figura 4.16**).

La molecola che ha dato i risultati migliori è la 13-(2-methylbenzyl)-berberine (o-CH_3-berberine) sia per i valori di legame sia per numero e completezza delle interazioni con gli amminoacidi presenti nella tasca. Questo EPI si è dimostrato il migliore anche nelle prove *in silico* e *in vitro* condotte su *P. aeruginosa*.

Tali evidenze computazionali unite ad alcuni risultati sperimentali pubblicati suggeriscono un forte interesse nella prosecuzione dello studio delle proprietà della berberina e suoi derivati come inibitori ad ampio spettro per gram-negativi MDR con pompe d'efflusso RDN (Karaosmanoglu 2014).

4.4 Identificazione di altri possibili siti di binding presenti in AcrB per la berberina e derivati

Le procedure di *blind docking* usati come controllo positivo nell'esperimento precedente hanno indicato l'esistenza di altri possibili siti di binding, pertanto il lavoro di tesi è proseguito con la loro identificazione, e mappatura.

Studi precedenti, sulle omologhe pompe d'efflusso MexY e MexB di *Pseudomonas aeruginosa*, pubblicati dal gruppo di Chimica Computazionale dell'UNIVPM presso cui ho svolto la mia attività di tesi, hanno individuato un nuovo sito di inibizione nel Cleft del Dominio Porter che ha permesso di individuare una strategia originale di inibizione che permette di progettare EPIs sinergici agli antibiotici come confermato da test *in vitro*; in particolare, in MexY, tale strategia è risultata efficace usando la berberina e i suoi derivati (Giorgini 2021).

Il protocollo sperimentale ha quindi previsto due diversi approcci per l'identificazione topologica degli altri siti presenti: 1) sovrapposizione della pompa di efflusso AcrB di *Escherichia coli* a quelle MexY di *P. aeruginosa* per riprodurre la posa nel Cleft (d'ora in avanti nominato *sito di inibizione* SDI) dell'orto-derivato della berberina (che anche negli esperimenti in *P. aeruginosa* si era rilevato il composto con le migliori attività sia *in silico* sia *in vitro*) analizzando nel dettaglio le energie di binding e confrontando i residui

interagenti e 2) un nuovo *blind docking* sull'intero Dominio Porter di AcrB, sempre utilizzando la berberina e i suoi derivati come ligandi, seguito da *focused docking* per le pose che mostravano i migliori valori nelle interazioni di legame.

4.4.1 Sovrapposizione di AcrB a MexY per riprodurre la posa di o-CH_3-berberina nel sito di inibizione

Il primo passaggio è stato decidere quale subunità di AcrB sovrapporre a PA7 (monomero di MexY ricostruito con la tecnica di modellazione molecolare *Homology Modeling*) per riprodurre al meglio la posa. Dopo aver provato tutte le combinazioni la subunità che si sovrapponeva meglio con PA7 era la A quindi ho lavorato con la conformazione *Loose*.

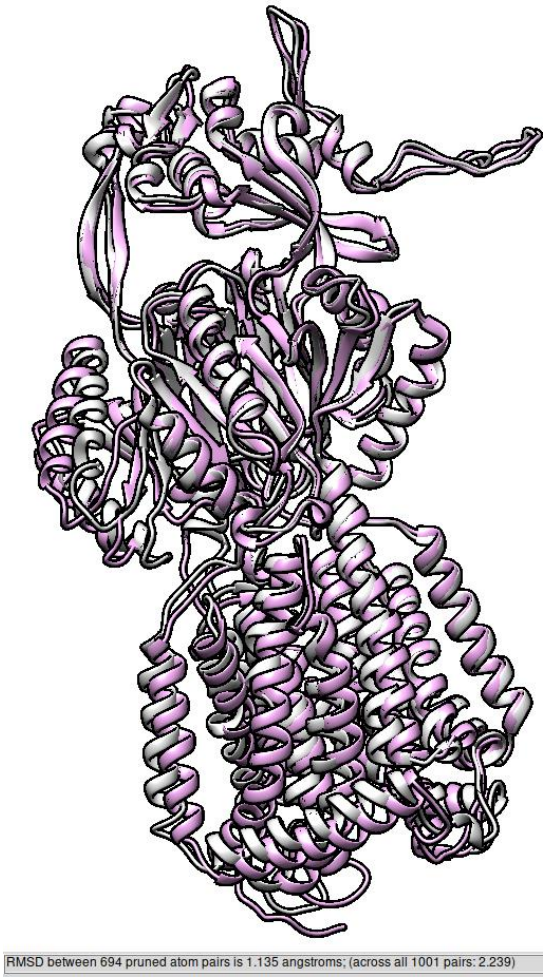


Figura 4.8. *In rosa è colorata AcrB sovrapposta a MexY in bianco. È riportato anche il calcolo dell'RMSD.*

La sovrapposizione strutturale e il calcolo dell'RMSD sono stati eseguiti con l'apposita funzione di USFC Chimera. L'RMSD (*Root Means Square Deviation*) viene calcolato per valutare quanto due strutture tridimensionali siano sovrapponibili. Tra le 694 coppie di atomi "*pruned*" è di 1.135 Å, la sovrapposizione è molto buona, mentre tra tutte le coppie di amminoacidi delle due strutture (1001 AA) è di 2.239 Å indicando comunque un buon risultato come si può apprezzare anche dell'immagine soprastante. Tale valore ci permette comunque di confrontare con buona attendibilità regioni/siti omologhi nelle due pompe prese d'esame.

Successivamente ho nuovamente sovrapposto la catena A di AcrB a PA7 contenente il ligando (o-CH_3-berberine) per riprodurre la posa dell'ortoderivato o quanto meno trovare la zona analoga di interazione tra le due pompe d'efflusso.

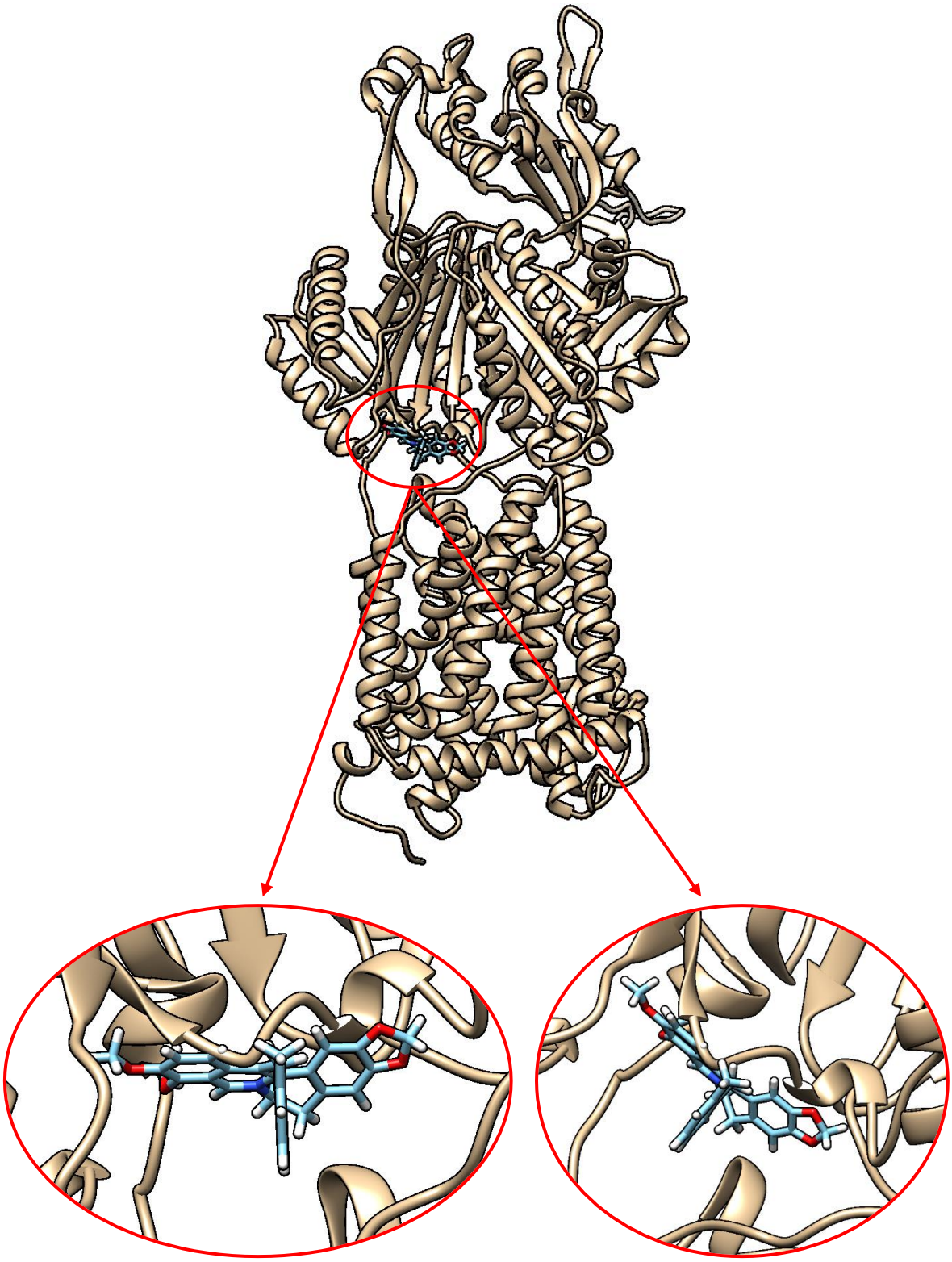


Figura 4.9. *Risultato della sovrapposizione di AcrB a PA7 con o-CH_3 e ingrandimento: l'inibitore va a compenetrare la struttura proteica escludendo pertanto che possa essere orientata in modo analogo su AcrB.*

Per cercare di correggere la posizione dell'inibitore all'interno del sito d'inibizione omologo di AcrB ho eseguito un *focused docking* centrando la *Grid Box*, delle dimensioni più piccole possibile, sul ligando.

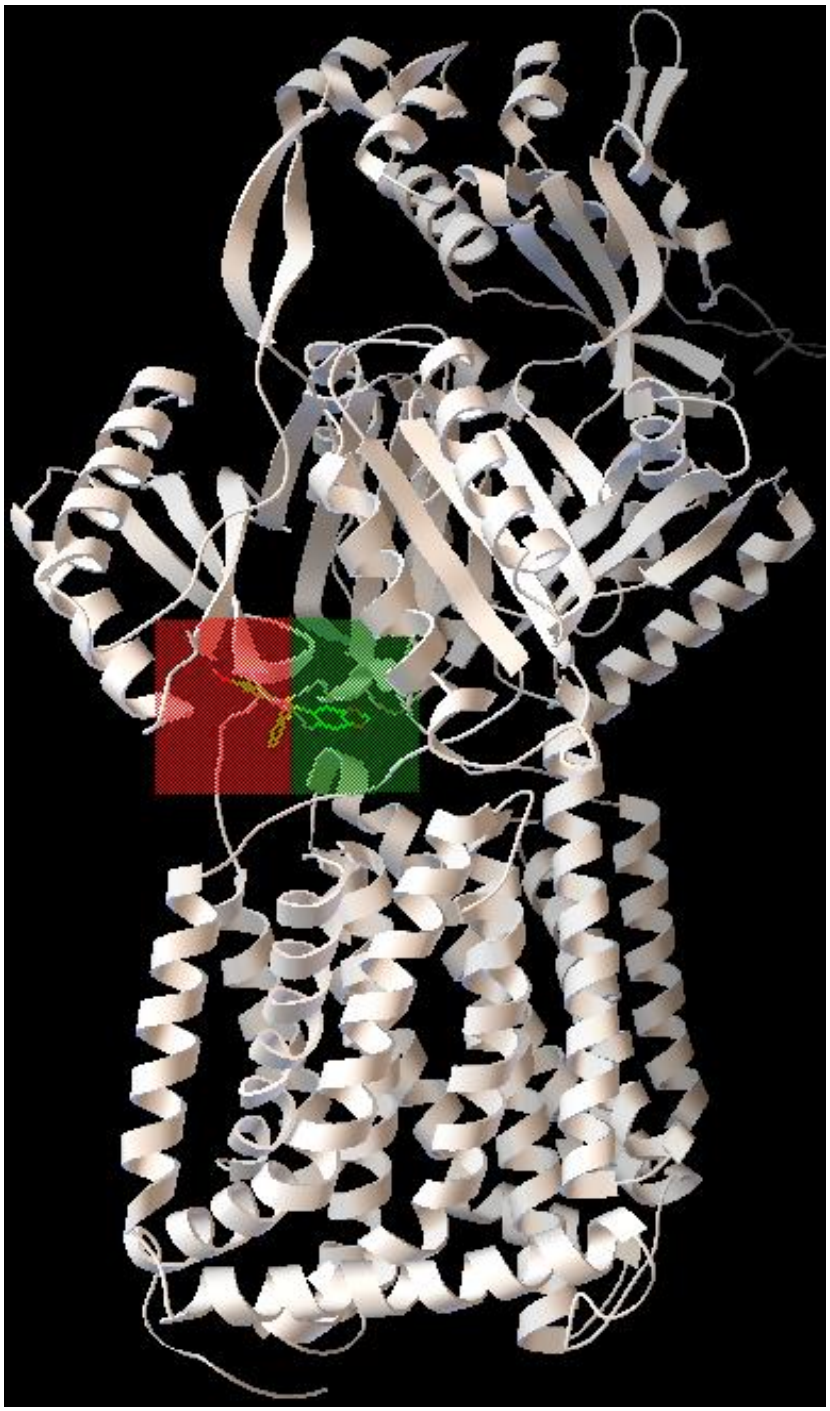


Figura 4.10. *Dettaglio della Grid Box centrata sul ligando.*

Come risultato ho ottenuto un *cluster* popolato da 86 pose (sulle 100 ricercate) con $E_{BINDING}$= -8.54 $^{kcal}/_{mol}$ e kI= 547.78 nM. Rispetto la posa precedente questo è orientato più internamente nel Sito di Inibizione.

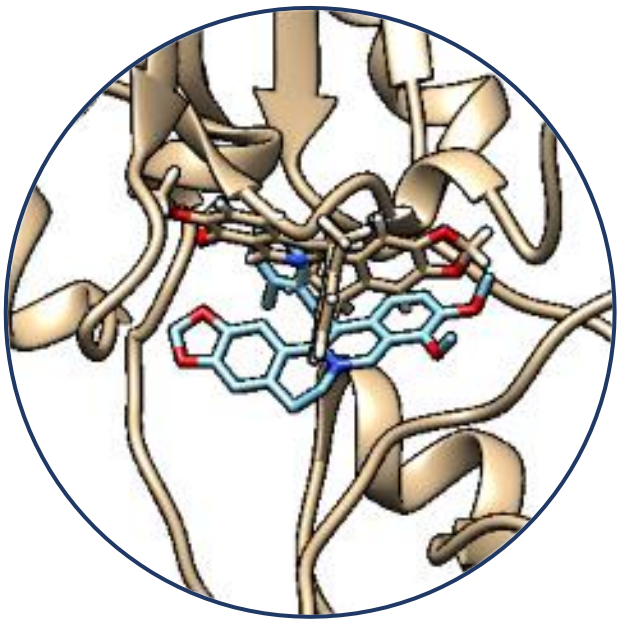


Figura 4.11. *Confronto tra o-CH_3-berberine dopo il focused docking, in celeste e senza gli idrogeni che devono essere riaggiunti al termine del processo, rispetto a prima quando compenetrava la struttura.*

Ho quindi esaminato i dieci residui del Sito di Inibizione con cui andava ad interagire il composto: SER562, PHE563, LEU564, ASP566, ALA670, LEU674, ALA677, THR837, MET862 e GLU866.

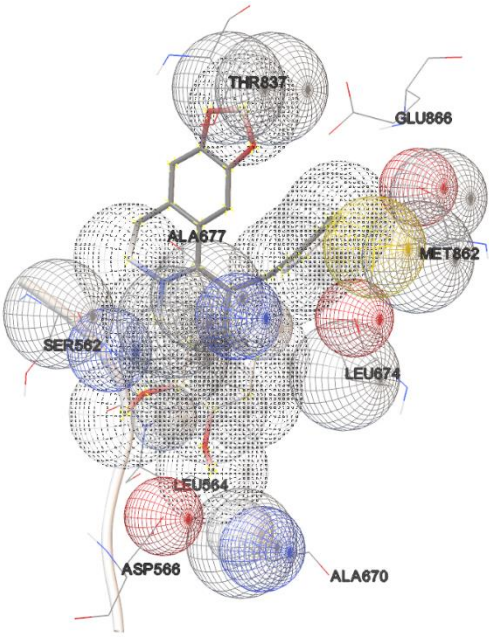


Figura 4.12. *Interazioni nel sito d'inibizione.*

Per confrontarli con quelli presenti sull'omologo Sito d'Inibizione di MexY ho dovuto fare un altro *focused docking*, centrando la *Grid Box* su o-CH_3-berberine in PA7.

Come risultato ho ottenuto un *cluster* con $E_{BINDING}$= -10.54 $^{kcal}/_{mol}$ e kI= 18.76 nM la cui posa si sovrappone perfettamente a quella dell'originale. I risultati del *docking* hanno valori molto migliori in MexY, tale differenza può essere attribuita alla diversa natura chimico-fisica degli amminoacidi che formano il *sito d'inibizione* SDI nei due trasportatori proteici omologhi.

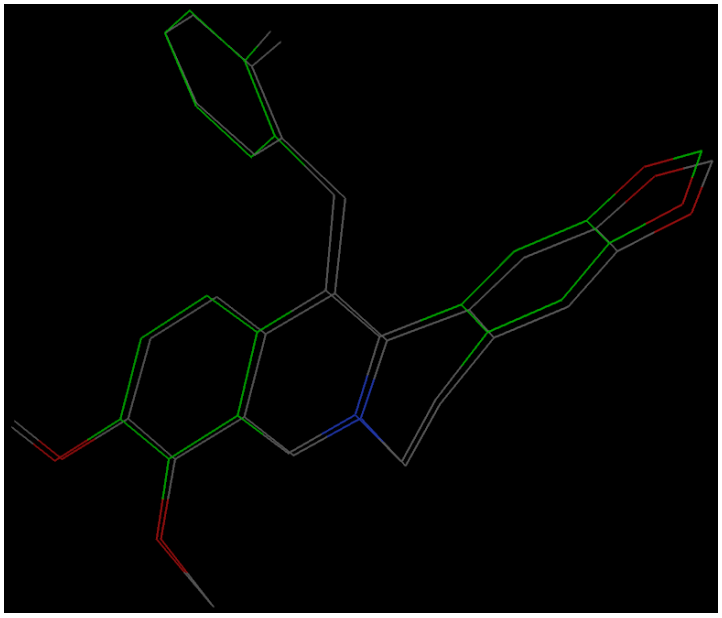


Figura 4.13. *Posa dockata sovrapposta ad originale in PA7.*

I residui interagenti in MexY sono i seguenti tredici: ALA559, PHE560, PRO664, SER673, PHE675, LEU707, ALA825, TYR829, SER830, SER831, GLU833, ALA834 e GLN856 e differiscono di molto rispetto per caratteristiche chimico-fisiche rispetto quelli presenti in AcrB.

Per confrontare i residui interagenti nel Sito d'Inibizione delle due pompe d'efflusso ho usato l'allineamento strutturale eseguito con Chimera.

Figura 4.14. *Confronto tra i residui presenti nel sito di inibizione di MexY, segnalati in nero sulla riga superiore, con quelli di AcrB, segnalati in rosso sotto la riga inferiore.*

In pochi casi i residui, o la loro posizione relativa all'interno della sequenza proteica, corrispondono o sono vicini suggerendo che il *sito d'inibizione* SDI, seppur presente in AcrB, possiede caratteristiche chimico-fisiche e di legame differenti da quello di MexY.

4.4.2 Nuovo *blind docking* di berberina e derivati nel dominio Porter e *focused docking* delle pose migliori nel *sito d'inibizione* e in quello *vestibolare*

Per mappare tutti i possibili siti di legame per gli inibitori si è proceduto col fare un nuovo *blind docking* sul Dominio Porter utilizzando la berberina e i suoi derivati come ligandi.

L'area di interazione compresa nella *Grid Box* includeva tutto il Dominio Porter. La conformazione di AcrB utilizzata è stata la *Loose* (subunità A di AcrB).

Sono stati riscontrati quattro siti di legame principali come raffigurato nell'immagine seguente. Questa è stata prodotta con altrettante pose significative del derivato p-CF_3-berberine ma è rappresentativa dei risultati ottenuti anche con la berberina e gli altri due derivati in quanto le loro pose vi si sovrappongono.

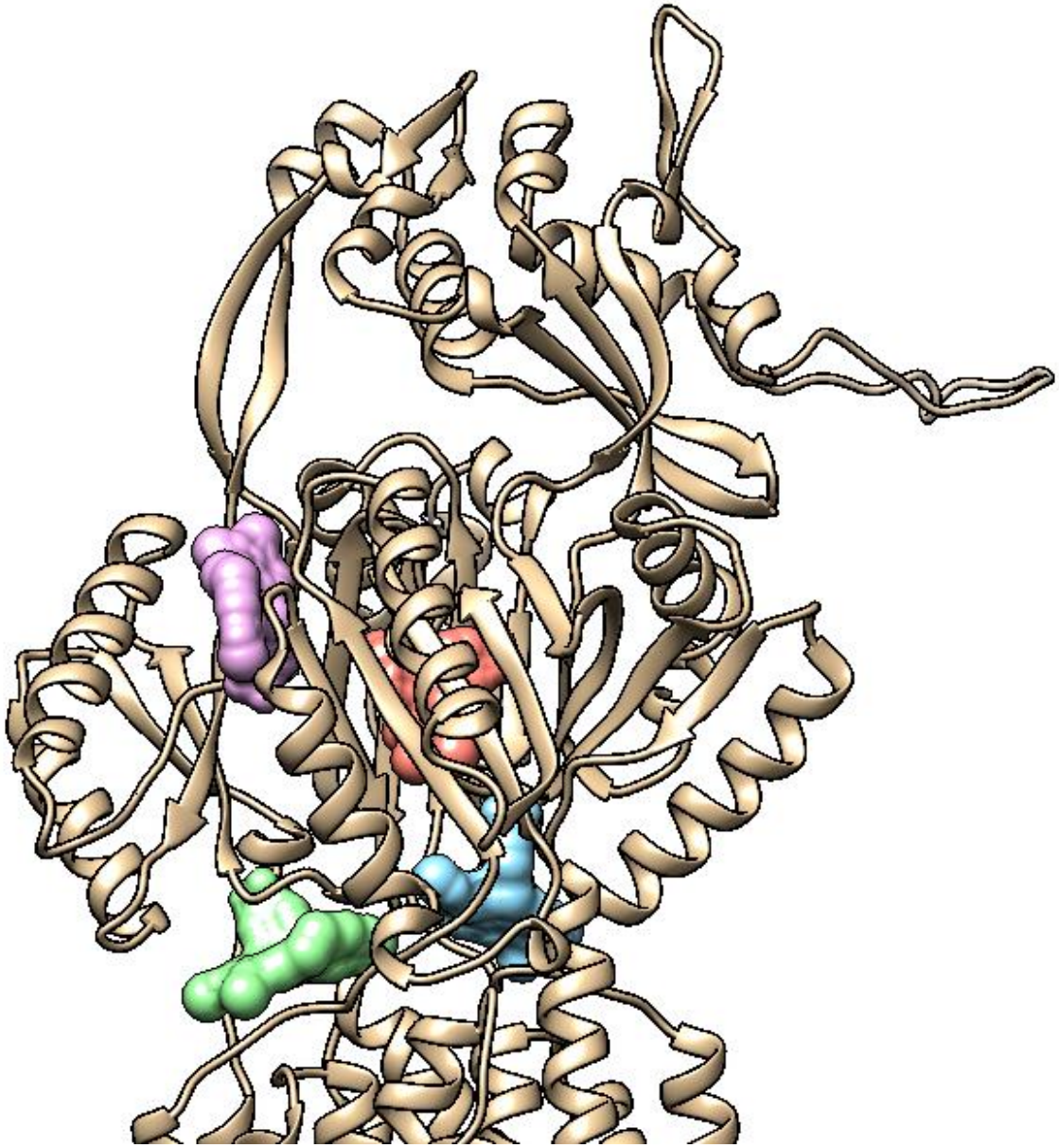


Figura 4.15. *In verde è colorata la posa dell'inibitore nel sito di inibizione, in celeste è indicato un nuovo promettente sito di legame d'ora in poi denominato "vestibolare", in rosa la via d'ingresso dal Cleft e in arancione ci troviamo nella zona del G-loop nei pressi della deep binding pocket.*

I siti di legame più interessanti trovati sono stati quello *vestibolare* SV e quello *d'inibizione* SDI (analizzato nel dettaglio già nel risultato precedente della tesi).

Per questi due siti di legame si è quindi proceduto con un *focused docking* per

la berberina e ogni suo derivato. Gli altri due siti di legame trovati, ovvero quello di *ingresso Cleft* e quello nei pressi del *G-loop* hanno mostrato risultati molto meno interessanti e sono stati perciò tralasciati da un'analisi più accurata.

Seguono i risultati dei *docking* suddivisi per ogni composto. È stata descritta l'$E_{BINDING}$ e la popolosità per tutti i *clusters* trovati.

L'ordine dei risultati va dai composti che hanno mostrato le migliori affinità ai peggiori: o-CH_3-berberine, p-CH_3-berberine, p-CF_3-berberine e berberina.

Evidenziata in celeste la posa del *sito vestibolare* su cui si è andata a centrare la *Grid Box* nel *focused docking* successivo, in verde quella del *sito d'inibizione* che è stata usata allo stesso modo.

4.4.2.1 o-CH_3-berberine

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Sito vestibolare		
1	-9.33	2
2	-9.25	2
3	-8.88	7
4	-8.87	5
5	-8.51	1
7	-8.46	1
8	-8.33	1
Sito d'inibizione		
6	-8.47	2
10	-8.21	4
12	-8.13	2
15	-7.82	1
16	-7.6	3
17	-7.6	1
Ingresso Cleft		
9	-8.26	11
13	-8.05	5
14	-7.84	16
G-loop		
11	-8.18	4

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito vestibolare		
1	-9.79	27
2	-9.37	3
3	-9.35	10
4	-9.35	10
5	-8.93	46
6	-8.92	3

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito d'inibizione		
1	-8.6	78
2	-8.29	15
3	-7.94	5

4.4.2.2 p-CH_3-berberine

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Sito vestibolare		
1	-8.99	2
3	-8.38	2
4	-8.32	1
5	-8.16	3
Sito d'inibizione		
6	-8.15	3
7	-8.07	7
8	-8.05	4
9	-8.03	3
10	-7.94	3
Ingresso Cleft		
2	-8.4	2
11	-7.88	3
12	-7.85	2
13	-7.79	3
15	-7.78	4
G-loop		
16	-7.74	1

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito vestibolare		
1	-9.17	2
2	-9.05	33
3	-8.84	39
4	-8.77	9
5	-8.72	3
6	-8.17	8
7	-8.16	6

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito d'inibizione		
1	-8.69	92
2	-7.67	8

4.4.2.3 p-CF_3-berberine

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Sito vestibolare		
1	-8.64	1
3	-8.3	4
5	-8.33	1
Sito d'inibizione		
4	-8.15	2
6	-7.88	2
8	-7.81	5
9	-7.78	1
14	-7.75	3
15	-7.52	3
Ingresso Cleft		
2	-8.64	4
11	-7.76	2
13	-7.69	1
G-loop		
7	-7.81	2

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito vestibolare		
1	-8.88	1
2	-8.75	26
3	-8.69	58
4	-8.22	5
5	-8.18	1
6	-8.15	3
7	-7.76	5

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito d'inibizione		
1	-8.18	79
2	-7.8	21

4.4.2.4 Berberina

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Sito vestibolare		
2	-7.25	6
4	-7.01	2
7	-6.79	1
8	-6.77	1
9	-6.75	1
10	-6.66	8
11	-6.55	1
12	-6.52	1
Sito d'inibizione		
6	-6.82	17
Ingresso Cleft		
1	-7.54	43
G-loop		
3	-7.04	14
5	-6.89	5

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito vestibolare		
1	-7.26	85
2	-6.98	6
3	-6.77	9

Cluster	$E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$)	Popolazione
Focused docking Sito d'inibizione		
1	-6.85	100

4.4.2.5 Discussione

Cluster	Sito	Popolazione	$E_{BINDING}$
o-CH_3-berberine			
1	Sito vestibolare	2	-9.33
1	Sito vestibolare FD	27	-9.79
6	Sito d'inibizione	2	-8.47
1	Sito di inibizione FD	78	-8.6
9	Ingresso Cleft	11	-8.26
11	G-loop	4	-8.18
p-CH_3-berberine			
1	Sito vestibolare	2	-8.99
2	Sito vestibolare FD	33	-9.05
2	Ingresso Cleft	2	-8.4
6	Sito di inibizione	3	-8.15
1	Sito di inibizione FD	92	-8.69
16	G-loop	1	-7.74
p-CF_3-berberine			
1	Sito vestibolare	1	-8.64
3	Sito vestibolare FD	58	-8.69
2	Ingresso Cleft	4	-8.64
4	Sito d'inibizione	2	-8.15
1	Sito di inibizione FD	79	-8.18
7	G-loop	2	-7.81
Berberina			
1	Ingresso Cleft	43	-7.54
2	Sito vestibolare	6	-7.25
1	Sito vestibolare FD	85	-7.26
3	G-loop	14	-7.04
6	Sito d'inibizione	17	-6.82
1	Sito di inibizione FD	100	-6.85

Tabella 4.14. *Tabella riepilogativa dei risultati dei docking. Quelli dei focused sono riportati sotto i blind docking da cui derivano (centrando una piccola Grid Box sulla posa ottenuta) evidenziati e siglati con FD.*

La *deep binding pocket* non è stata trovata in questo esperimento perché si è lavorato con la conformazione *Loose* di AcrB dove, come riportato in

letteratura, questa tasca è molto stretta non permettendo l'accesso e una buona interazione ai ligandi durante il *molecular docking*. Tale sito diventa accessibile soltanto durante la fase di espulsione e in particolare nella transizione conformazione da *Loose* a *Tight* (Reading 2020).

Il *sito d'inibizione* è stato invece ritrovato, confermando la bontà dell'esperimento precedente dove è stata eseguita la mappatura dello stesso sovrapponendo AcrB alla pompa di efflusso omologa MexY di *P. aeruginosa*.

Trovare il nuovo sito di legame chiamato *sito vestibolare* è un risultato *importante* considerando le ottime proprietà di legame che mostrano questi inibitori interagendovi.

Il *sito vestibolare* è stato perciò analizzato più nel dettaglio e i 18 amminoacidi che interagiscono con l'orto-derivato della berberina, che ha maggior affinità con lo stesso, hanno avuto una prima mappatura (VAL32, ALA33, GLN34, TYR35, PRO36, THR37, ILE38, ALA39, ASN298, ALA299, LEU300, VAL333, PRO669, ALA670, ILE671, VAL672 e GLU673).

In conclusione, durante lo studio topologico sulla pompa d'efflusso AcrB di *E. coli*, ho vagliato con estrema cura la struttura del trasportatore proteico utilizzando la berberina e i suoi derivati e trovando tre possibili siti di inibizione che mostrano proprietà molto interessanti.

Nella *deep binding pocket*, nel *sito d'inibizione* e nel *sito vestibolare* verranno poi testati molti EPI, noti dalla letteratura e collezionati, tramite *High-Throughput Virtual Screening* durante il proseguo del mio lavoro di tesi.

4.5 Stato dell'arte sugli EPI noti per AcrB

Dopo aver concluso la mappatura dei possibili siti di legame ho cercato, nella letteratura, gli EPI già noti per la pompa d'efflusso AcrB di *Escherichia coli*.

Sono state trovate, collezionate, descritte, valutate e classificate 83 ricerche, che abbracciano il periodo compreso tra il 2001 e il 2021 (quindi gli ultimi 20 anni di ricerche disponibili sull'argomento), con particolare attenzione ai lavori dove l'effetto di inibizione dei composti EPI è stato testato insieme ad antibiotici per quantificare il loro effetto sinergico sulla MIC di *E. coli*.

Parte di queste ricerche era focalizzata su aspetti differenti della pompa d'efflusso AcrB; segue la tabella con una classificazione degli articoli collezionati.

Categoria	**N°**
Review	10
Ricerche sugli inibitori	40
Ricerche sulla struttura e il meccanismo d'azione	17
Altro (composti testati su pompe omologhe di altri microrganismi, composti con attività antibatterica, antibiotici, estratti e substrati)	16
Totale	**83**

Tabella 4.15. *Classificazione delle ricerche trovate.*

Dalla pagina seguente troveremo la tabella con riportate le ricerche collezionate e le informazioni essenziali su di esse.

N°	Anno	Primo/ultimo autore	Titolo	Descrizione
1	2021	Giorgini/Galeazzi	Berberine Derivatives as *Pseudomonas aeruginosa* MexXY-OprM Inhibitors: Activity and In Silico Insights	Studio *in silico* e *in vitro* sull'attività EPI di berberina e derivati su MexY di *P. aeruginosa*.
2	2021	Zgurskaya/Ruggerone	Bacterial efflux transporters' polyspecificity – a gift and a curse?	Articolo che descrive nel dettaglio struttura, topologia, substrati estrusi e EPI per i trasportatori RND. Non sono presenti MIC.
3	2020	Atzori/Ruggerone	Molecular Interactions of Carbapenem Antibiotics with the Multidrug Efflux Transporter AcrB of *Escherichia coli*	Struttura, meccanismo d'azione e studio *in silico* di substrati e inibitori co-cristallizzati (MBX e D13-9001) e delle carbapenemasi. Non sono presenti MIC.
4	2020	Green/Zgurskaya	Discovery of multidrug efflux pump inhibitors with a novel chemical scaffold	Saggi fluorescenti dove viene testato il potere antimicrobico e l'attività EPI di 6 derivati del 4(3-aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amines.
5	2020	Grimsey/Piddock	Chlorpromazine and Amitriptyline Are Substrates and Inhibitors of the AcrB Multidrug Efflux Pump	MIC di vari composti diretti contro *S. enterica* sierotipo Typhimurium ed *E. coli* con amitriptyline e chlorpromazine analizzati dettagliatamente come inibitori della pompa d'efflusso.
6	2020	Johnson/Bavro	Cryo-EM Structure and Molecular Dynamics Analysis of the Fluoroquinolone Resistant Mutant of the AcrB Transporter from *Salmonella*	Studio della struttura, risolta tramite crio-microscopia elettronica, e della topografia della pompa AcrB di *S. enterica* e studio comparativo *in silico* con quella di *E. coli*. *PDB code*: 2J4S e 4DX5.
7	2020	Reading/Politis	Perturbed structural dynamics underlie inhibition and altered specificity of the multidrug efflux pump AcrB	Meccanismo d'azione (rotazione concertata) investigato con spettroscopia di massa e dinamica molecolare. MIC di PAβN con ciprofloxacina e minociclina.
8	2020	Seukep/Guo	Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification	Review nella quale vengono descritti i principali sistemi di pompe di efflusso presenti nei batteri e le principali strategie per contrastarli. È presente una tabella dove sono riportati moltissimi EPI di origine naturale e indicate le ricerche che li hanno studiati.

9	2020	Tam/Pos	Binding and Transport of Carboxylated Drugs by the Multidrug Transporter AcrB	Studio *in silico* e *in vitro* (MIC) di diversi β-lattamici e altre molecole (acido fusidico, dicloxacillina, oxacillina e piperacillina) di cui si è testato il potere antimicrobico.
10	2020	Vergalli/Pagès	The challenge of intracellular antibiotic accumulation, a function of fluoroquinolone influx versus bacterial efflux	Studio dettagliato sugli antibiotici dove viene testato l'accumulo intracellulare di molti fluorochinoloni attivi contro *E. coli*.
11	2019	Kobylka/Pos	AcrB a mean, keen, drug efflux machine	Lunga ed esaustiva review sui diversi tipi di pompe presenti nei Gram-negativi con particolare attenzione per AcrB di *E. coli* (struttura, conformazioni, substrati e topologia).
12	2019	Sharma/Pathania	Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside	Review sugli EPI conosciuti per i microrganismi compresi quelli efficaci contro AcrB di *E. coli*.
13	2018	Reens/Detweiler	A cell-based infection assay identifies efflux pump modulators that reduce bacterial intracellular load	Saggi fluorimetrici, EtBr e MIC su *Salmonella* ed *E. coli* con diversi composti modulatori dell'attività delle pompe come EPM30, EPM35 e EPM43.
14	2018	Vargiu/Ruggerone	Computer simulations of the activity of RND efflux pumps	Studio *in silico* del meccanismo d'azione e della topologia con mappatura delle tasche di AcrB.
15	2018	Vargiu/Ruggerone	Water-mediated interactions enable smooth substrate transport in a bacterial efflux pump	Struttura e meccanismo d'azione di AcrB investigati con diverse simulazioni *in silico*.
16	2018	Wang/Venter	Design, synthesis and biological activity evaluation of novel 4-subtituted 2-naphthamide derivatives as AcrB inhibitors	Attività EPI testata per molti composti. A3 [4-(3-Methylbutoxy)naphthalene-2-carboxamide] e PAβN testati in sinergia con di eritromicina e cloramfenicolo mostrano effetto sinergico sulla MIC. Sono stati testati anche altri 16 derivati N-sostituiti di 4-(benzyloxy)-2-naphthamide, 4-(isopentyloxy)-2-naphthamide), 4-(alkylaminoethoxy)-2-naphthamide e 4-(arylethoxy)-2-naphthamide.

17	2017	Haynes/Walker	Identification and Structure−Activity Relationships of Novel Compounds that Potentiate the Activities of Antibiotics in *Escherichia coli*	Sono stati testati molti composti ma i più interessanti sono NSC 60339, SLUPP-225 e SLUPP-417 che potenziano l'attività di eritromicina e novobiocina.
18	2017	Machado/Viveiros	Mode of action of the 2-phenylquinoline efflux inhibitor PQQ4R against *Escherichia coli*	Valutazione EPI con saggi di efflusso e MIC per chlorpromazine, PAβN e PQQ4R.
19	2017	Puzari/Chetia	RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* a major issue worldwide	Studio sull'antibiotico-resistenza e sulle pompe di efflusso di *E. coli* e *P. aeruginosa*: sono descritti diversi EPI.
20	2017	Spengler/Amaral	New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria	I meccanismi di antibiotico-resistenza e le pompe d'efflusso nei batteri sono descritti dettagliatamente insieme al meccanismo di azione di AcrB. Spiegati anche i saggi con cui hanno viene testata l'attività delle pompe (EtBr o altri coloranti fluorescenti). Descrive EPI naturali (come ferruginol, karavilagenin C, jatropholone A e uvaol) e artificiali (come CCCP, PAβN e thioridazine).
21	2017	Wang/Du	An allosteric transport mechanism for the AcrAB-TolC multidrug efflux pump	Ricerca su una struttura risolta con CRIO-EM di AcrB più studi sul meccanismo d'azione (mappatura interazioni dell'inibitore MBX3132), topologia e connettività con AcrA e TolC.
22	2016	Bohnert/Kiec-Kononowiczc	Novel Piperazine Arylideneimidazolones Inhibit the AcrAB-TolC Pump in *Escherichia coli* and Simultaneously Act as Fluorescent Membrane Probes in a Combined Real-Time Influx and Efflux Assay	Testate cinque piperazine arylideneimidazolones come inibitori di AcrB: BM-19 e BM-38 mostrano le performance migliori e sono state collezionate. Anche BM-9 e BM-27 hanno potere EPI ma minore. MIC con antibiotici e saggi d'efflusso.

23	2016	Kinana/Nikaido	Aminoacyl β-naphthylamides as substrates and modulators of AcrB multidrug efflux pump	Test *in silico* e saggi di efflusso di PAβN e altri tre peptidomimetici.
24	2016	Liu/Zhao	Resveratrol Antagonizes Antimicrobial Lethality and Stimulates Recovery of Bacterial Mutants	Resveratrolo testato su *E. coli* e *Staphylococcus aerus*. MIC con diversi antibiotici.
25	2016	Mahmood/Rahman	Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps	Buona review su antibiotico-resistenze, pompe ed inibitori. Sono ben spiegati i diversi tipi di EPI, suddivisi per classi con molti esempli.
26	2016	Miladi/Chaieb	Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens	Viene testata attività antimicrobica ed EPI (effetto sinergico con antibiotici) di carvacrolo e timolo per molti batteri tra cui *E. coli*. Presenti anche saggi di accumulo/efflusso con EtBr.
27	2016	Ramaswamy/Vargiu	Multidrug Efflux Pumps and Their Inhibitors Characterized by Computational Modeling	Review sulle pompe e le strategie per inibirle descrivendo gli studi computazionali che vengono fatti per trovare molecole con attività EPI sulla pompa.
28	2016	Seukep/Kuete	Antibacterial and antibiotic-resistance modifying activity of the extracts and compounds from *Nauclea pobeguinii* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes	Hanno testato sei estratti di origine naturale, sia per effetto EPI sulle MIC sia per il loro potere antibatterico sia MIC in associazione con antibiotici. Resveratrolo testato come composto isolato.
29	2016	Sjuts/Opperman	Molecular basis for inhibition of AcrB multidrug efflux pump by novel and powerful pyranopyridine derivatives	Studio cristallografico e di *molecular docking* per vedere come le piranopirimidine (MBX2319, MBX-2931, MBX-3132, MBX-3135) agissero per inibire AcrB. È stata valutata anche l'azione sinergica con ciprofloxacina e saggi fluorimetrici.

30	2016	Song/Zhou	Design of New Antibacterial Enhancers Based on AcrB's Structure and the Evaluation of Their Antibacterial Enhancement Activity	Analisi computazionali per DHA7 e altri 22 composti, per alcuni è stata testata l'attività antibatterica e l'effetto sinergico con l'ampicillina. In DHA27 l'attività EPI è stata confrontata anche con PAβN.
31	2015	Anes/Martins	The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*	Studio dettagliato, riepilogativo e comparativo di AcrB: geni, meccanismo d'azione e substrati estrusi.
32	2015	Dwivedi/Srivastava	Drug Resistance Reversal Potential of Ursolic Acid Derivatives against Nalidixic Acid- and Multidrug-resistant *Escherichia coli*	Acido ursolico, 6 suoi derivati, e reserpine testati per l'attività sinergica con acido nalixidico; anche saggi di efflusso EtBr. Sono state inoltre analizzate le interazioni *in silico*.
33	2015	Li/Nikaido	The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria	Review dettagliata dove sono descritti i sistemi di efflusso di moltissimi microrganismi. Sono riportati gli antibiotici ben estrusi da AcrB e anche la descrizione minuziosa di arylpiperidines [3-fluoro-2-(2-chloro-5-bromophenylethyl)-piperidine e pimozide], chinoline [2,8-dimethyl-3-(pyrrolidinoethyloxy)quinoline], D13-9001, MBX2319, NMP, PAβN e sertralina.
34	2015	Nguyen/Opperman	Structure–activity relationships of a novel pyranopyridine series of Gram-negative bacterial efflux pump inhibitors	Testato MBX2319 e 60 suoi analoghi neosintetizzati.
35	2015	Opperman/Nguyen	Recent advance stoward a molecular mechanism of efflux pump inhibition	Review: mappaggio residui tasca idrofobica e G-loop. Descrizione delle principali classi di EPI e del loro meccanismo di azione: PAβN e altri peptidomimetici [L-Phe-(Me)-L-Orn- β-Na, D-Orn-D-hPhe-3-NHQ], NMP e altri analoghi dell'arylpiperazine, D13-9001 e MBX2319.
36	2015	Yamaguchi/Sakurai	Structural basis of RND-type multidrug exporters	Descrizione molto dettagliata della struttura e del meccanismo d'azione di AcrB. Substrati estrusi e non (kanamicina e piranopirimidine),

				confronto con le pompe d'efflusso MexB e MexY con studio computazionale topografico sul percorso seguito dalle molecole durante l'estrusione. Viene indagata anche la dinamica di inibizione.
37	2015	Yilmaz/Yalcin	Binding site feature description of 2-substituted benzothiazoles as potential AcrAB-TolC efflux pump inhibitors in *E. coli*	Viene spiegato il meccanismo di azione (rotazione concertata) e sono testati 14 derivati del benzotiazolo BSN per il loro potere antibatterico e attività EPI in associazione con ciprofloxacina. Studio anche *in silico* con saggi di docking e mappatura dei residui interagenti.
38	2014	Aparna/Hopper	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	Vengono analizzati, *in silico* ed *in vitro*, molti EPI: acido gentisico, acido protocatecuico, CCCP, diadzeina, lanatoside C, PAβN, scopolamine e umbelliferone. Effetto EPI valutato per le MIC di carbenicillina e levofloxacina in *E. coli* e *P. aeruginosa*. Per CCCP, diadzein e levofloxacin è presente anche un saggio di inibizione mediante efflusso EtBr.
39	2014	Bag/Chattopadhyay	Efflux-pump inhibitory activity of a gallotannin from *Terminalia chebula* fruit against multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*	Articolo dove viene descritta l'attività antimicrobica e EPI del gallotannino (1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucopyranose). Viene testata anche attività EPI di PAβN. Nel materiale supplementare troviamo le MIC per gentamicina e trimethoprim e i test di accumulo ed efflusso di EtBr. Studio condotto su *E. coli* dove non viene però specificata AcrB ma solo una più generica "attività diretta contro le pompe".
40	2014	Ohene-Agyei/Venter	Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump	Studio *in silico* con *molecular docking* e mappatura dei residui coinvolti, potere antibatterico, attività di EPI e saggi di efflusso di NDGA, PAβN, plumbagina, e shikonin.
41	2014	Opperman/Bowlin	Characterization of a Novel Pyranopyridine Inhibitor of the AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*	Effetto sinergico sulla MIC di MBX2319 e PAβN con ciprofloxacina, levofloxacina, piperacillina, cefotaxima e molti altri antibiotici. Inoltre, saggi di fluorescenza.

42	2014	Touani/Kuete	Antibiotic-potentiation activities of four Cameroonian dietary plants against multidrug-resistant Gram-negative bacteria expressing efflux	Sono stati testati, per il loro potere antibatterico ed effetto EPI, gli estratti da quattro piante alimentari camerunensi su diverse specie microbiche. Dagli estratti non hanno purificato molecole isolate.
43	2014	Vargiu/Nikaido	Molecular Mechanism of MBX2319 Inhibition of *Escherichia coli* AcrB Multidrug Efflux Pump and Comparison with Other Inhibitors	Studio delle interazioni *in silico* e dell'effetto sinergico sulla MIC di D13-9001, MBX2319, NMP e PAβN testati con diversi antibiotici.
44	2013	Bohnert/Kern	Pimozide inhibits the AcrAB-TolC efflux pump in *Escherichia coli*	Studio specifico dell'attività EPI di CCCP e pimozide: MIC e saggi EtBr.
45	2013	Brunel/Bolla	Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant Gram-negative bacteria	È testato l'effetto antimicrobico di molti composti su *E. coli*. È anche testata l'attività sinergica, con due antibiotici, di PAβN e di 11 derivati dell'acido geranico su *Enterobacter aerogenes* e *Salmonella*.
46	2013	Nakashima/Yamaguchi	Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters	Studio *in silico* delle interazioni di D13-9001 e test *in vitro* sulla curva di crescita. Inoltre, comparazione tra AcrB, MexB e MexY. Non sono presenti MIC.
47	2013	Ruggerone/Vargiu	RND Efflux Pumps: Structural Information Translated into Function and Inhibition Mechanisms	Studio sul meccanismo di espulsione di diversi substrati (l'affinità di legame viene investigata con studi *in silico*) e sulle interazioni con alcuni inibitori (acido taurocolico, D13-9001, NMP e PAβN) inclusa un'accurata mappatura dei residui implicati.
48	2012	Eicher/Pos	Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop	Studio del meccanismo di azione e mappatura dei residui interagenti usando minociclina e doxorubicina.

49	2012	Vargiu/Nikaido	Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations	Studio *in silico* delle interazioni con molti composti. Non sono presenti MIC ma vengono descritti molti EPI ed antibiotici.
50	2011	Bohnert/Kern	Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in *Escherichia coli*	Testato il potenziale antimicrobico di vari SSRI (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) e l'attività sinergica della sertralina con diversi antibiotici.
51	2011	Garvey/Piddock	Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria	Sono stati testati estratti di diverse piante diretti contro AcrB di *E. coli* e *S. enterica* sierotipo Typhimurium; su quest'ultima sono stati testati acido linoleico e falcarindiolo per la loro proprietà di EPI.
52	2011	Kuete/Pagès	Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype	Sono presenti le MIC di diversi composti naturali testati su vari microrganismi: non è testata l'attività di EPI ma l'attività antimicrobica.
53	2011	Li/Zhou	Artesunate enhances the antibacterial effect of b-lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC	Testata l'attività inibitoria, diretta contro la pompa AcrB, dell'artesunate insieme molti antibiotici su diversi ceppi di *E. coli*. Attività sinergica sulla MIC, inibizione della crescita, accumulo di colorante, attività antimicrobica e possibile effetto inibitorio sull'mRNA dei geni che codificano per le componenti della pompa.
54	2011	Martins/Amaral	Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*	Testata l'attività antimicrobica di diversi composti naturali estratti da *Carpobrutus edulis* e l'attività EPI di β-amyrin, catechina, epicatechina, monogalactosyldiacylglycerol, acido oleanolico e uvaolo in associazione con la tetraciclina e in saggi di efflusso con EtBr.
55	2011	Martins/Amaral	Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method	Testato l'effetto sinergico di chlorpromazine, PAβN e thioridazine sulle MIC di tetraciclina e ciprofloxacina per molti ceppi di *E. coli*. Anche saggi EtBr.

56	2011	Martins/Amaral	Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli*	Saggi EtBr per valutare l'effetto della chlorpromazine e dell'EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) come inibitori delle pompe; viene usato anche il calcio come modulatore.
57	2011	Nakashima/Yamaguchi	Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket	Studio del meccanismo di azione e della struttura di AcrB con mappatura delle interazioni utilizzando rifampicina ed eritromicina.
58	2011	Pagès/Fanning	An Original Deal for New Molecule: Reversal of Efflux Pump Activity, A Rational Strategy to Combat Gram-Negative Resistant Bacteria	Descritta la struttura e il meccanismo d'azione di AcrB con particolare dettaglio al flusso protonico e come inattivarlo (in di *E. coli* e in *Salmonella*). Sono poi descritti diversi EPI: 3 arylpiperidine-derivati, BG1162-1167, BG814, BG905, CCCP, chlorpromazine, D13-9001, MC-04,134, NMP, PAβN, reserpine.
59	2011	Ramalhetea/Amaral	Inhibition of efflux pumps in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* resistant strains by triterpenoids from *Momordica balsamina*	Balsaminagenin A, balsaminagenin B, balsaminol A, balsaminol F, balsaminoside A e karavilagenin C testati come EPI su MRSA e *E. faecalis*. Struttura sperimentale della pompa d'efflusso di *E. faecalis* non disponibile perciò non ho potuto procedere al confronto con quella di *E. coli*.
60	2011	Takaks/Amaral	Evaluation of Forty New Phenothiazine Derivatives for Activity Against Intrinsic Efflux Pump Systems of Reference *Escherichia coli, Salmonella Enteritidis, Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* Strains	Hanno testato l'effetto di 40 derivati delle phenothiazine (come chlorpromazine, Methylene Blue, promethazine and thioridazine) su diverse specie batteriche (tra cui *E. coli*) tramite accumulo di EtBr. Molte molecole ma mancano studi *in vitro* sulla MIC.

61	2010	Piddock/Gibbons	Natural and synthetic compounds such as trimethoprim behave as inhibitors of efflux in Gram-negative bacteria	Effetto EPI di noradrenalina (con eritromicina), PAβN (con ciprofloxacina e tetraciclina) e teobromina (con ciprofloxacina) su *E. coli*. Effetto EPI di adrenalina e teofillina testato su *S. enterica* sierotipo Typhimurium.
62	2010	Takatsuka/Nikaido	Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*	Substrati efflussi da AcrB e studi computazionali sui meccanismi d'azione.
63	2009	Jung/Sutherland	Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria	Viene testato il potere antibatterico del resveratrolo.
64	2009	Li/Nikaido	Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. An Update	Lunga review sulle pompe di efflusso nei batteri con tabella che riporta molti inibitori.
65	2009	Lorenzi/Bolla	Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species	Viene testato olio essenziale ma non i composti isolati su *E. coli*. Per *Enterobacter aerogenes* invece è stato testato il geraniolo ma, sul PDB, non è presente AcrB di *E. aerogenes*, o altre omologhe per confronto.
66	2009	Pagès/Amaral	Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria	Descrivono D13-9001, NMP, PAβN e altri tre nuovi composti: BG814, BG905 e MC-04,124 per i quali si può approfondire la bibliografia (presenti anche nella ricerca n° 58).
67	2009	Paixão/Viveiros	Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*	Descrizione dei saggi al EtBr in *E. coli* utilizzando anche chlorpromazine e glucosio. Nessuna MIC.
68	2009	Pos	Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump	Viene ben descritto il meccanismo di rotazione concertata delle conformazioni asincrone. Presente una tabella con substrati estrusi e EPI.
69	2009	Zechini/Versace	Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria	Articolo dove vengono elencate le pompe presenti nei batteri e le principali strategie per bloccarle.

70	2008	Martins/Amaral	Potential role of non-antibiotics (helper compounds) in the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections: mechanisms for their direct and indirect activities	Testato il potere antibatterico di diversi derivati delle fenotiazine come clorpromazina, promazina e trifluprομazina.
71	2008	Viveiros/Amaral	Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method	Saggi al EtBr per clorpromazina, PAβN e tioridazina. Non sono presenti MIC.
72	2007	Stavri/Gibbons	Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources	Review dove sono descritti diversi EPI.
73	2006	Lomovskaya/Bostian	Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use	Pompe di efflusso, antibiotico-resistenza ed EPI: descrizione di alcuni e strategie per perfezionarli.
74	2006	Murakami/Yamaguchi	Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism	Descrizione della struttura e del meccanismo di azione della pompa d'efflusso AcrB.
75	2006	Seeger/Pos	Structural Asymmetry of AcrB Trimer Suggests a Peristaltic Pump Mechanism	Descritto il meccanismo d'azione (rotazione concertata delle conformazioni asincrone) della pompa d'efflusso AcrB.
76	2005	Viveiros/Amaral	Inducement and Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* K-12 and Expression of Proton Gradient-Dependent Multidrug Efflux Pump Genes	Testati antibiotici e substrati in ceppi ingegnerizzati e mutati di *E. coli*.
77	2005	Bohnert/Kern	Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps	MIC di diversi antibiotici testati in sinergia con NMP e PAβN. Saggio di accumulo della levofloxacina con CCCP e mTFMPP (1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine).

78	2005	Pagès/Barbe	Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria	Review con riportati molti EPI.
79	2005	Poole	Efflux-mediated antimicrobial resistance	Review sulle pompe d'efflusso che conferisco antibiotico-resistenza nei batteri.
80	2004	Poole	Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria	Review che compara le pompe d'efflusso, e la loro presenza, nei diversi Gram-negativi.
81	2002	Murakami/Yamaguchi	Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB	Studio dove si descrive la struttura tridimensionale della pompa attraverso cristallografia con risoluzione 3.5Å.
82	2001	Lomovskaya/Lee	Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy	Studio principalmente svolto su *P. aeruginosa* dove viene già impiegato PAβN. Su *E. coli* è stato fatto un saggio fluorescente con CCCP, MC-002,595 e NPN.
83	2001	Thorarensen/Yagi	3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents	È stato testato il potere EPI (con linezolid), mediante saggio di accumulo dei substrati, per PAβN e molti suoi derivati.

Tabella 4.16. *Nella tabella sono riportate il titolo della ricerca, il primo e l'ultimo autore, l'anno di pubblicazione, una breve descrizione della stessa e il numero assegnatogli.*

In celeste sono evidenziati gli articoli o i composti che si potrebbero approfondire per trovare nuovi EPI.

In verde sono segnalati gli EPI testati solo con saggi di efflusso/accumulo/fluorescenza o gli inibitori testati su AcrB di Salmonella (vedi pagina seguente per spiegazione più esaustiva).

N. d. R. *Queste ricerche, a meno che non vengano usate per referenziare asserzioni presenti nel corso della tesi, non saranno inserite nella bibliografia finale.*

Segue una tabella riepilogativa di tutti i composti trovati.

Categoria	Composti identificati	N°
EPI, attivi sulla pompa d'efflusso AcrB di *E. coli*, di cui è stata testata l'attività in test microbiologici *in vitro* insieme ad antibiotici per quantificare l'effetto sinergico sulla MIC del microrganismo. Spesso sono disponibili anche saggi di efflusso.	β-amyrin, A3, amitriptyline, artesunate, BM-19, BM-38, carvacrolo, cathechina, CCCP, clorpromazina, D13-9001, DHA27, diadzeina, epicatechina, gallotannino, lanatoside C, MBX2319, MBX2931, MBX3132, MBX3135, NDGA, NMP, norepinephrine, NSC 60339, oleanolic acid, PAβN, pimozide, plumbagina, protocatechuic acid, reserpina, resveratrolo, scopolamina, sertralina, shikonin, SLUPP-225, SLUPP-417, teobromina, tioridazina, timolo, ursolic acid e uvaolo.	41
EPI testati, sulla pompa d'efflusso AcrB di *E. coli*, esclusivamente con saggi di efflusso.	3 peptidomimetici. 40 derivati delle phenothiazine. mTFMPP. MC-002,595 e NPN.	46 (6)
EPI testati su AcrB di *Salmonella* (ID: 94,47% - RMSD < 2Å).	11 derivati dell'acido geranico. Acido linoleico e falcarindiolo. Epinefrina e teofillina. Inoltre, sono state segnalate un paio di ricerche da cui, approfondendo la bibliografia, si potrebbero trovare nuovi EPI.	15 (4)
Stima degli EPI che si potrebbero trovare approfondendo la ricerca bibliografica.	6 derivati del 4(3-aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amines. EPM30, EPM35 e EPM43. 16 N-derivati di 4-(benzyloxy)-2-naphthamide, 4-(isopentyloxy)-2-naphthamide, 4-(isopentyloxy)-2-naphthamide), 4-(alkylaminoethoxy)-2-naphthamide e 4-(arylethoxy)-2-naphthamide. PQQ4R. BM-9 e BM-36. DHA-7 e altri 22 DHA-derivati. 6 derivati dell'acido ursolico. 60 MBX2319-derivati. L-Phe-(Me)-L-Orn- β-Na e D-Orn-D-hPhe-3-NHQ. 14 BSN-derivati. Monogalactosyldiacylglycerol. 3 arylpiperidine-derivati, BG1162-1167, BG814, BG905 e MC-04,134. Inoltre, sono state segnalati una decina di articoli di cui si potrebbe approfondire la bibliografia per trovare nuovi EPI.	141 (14)

Tabella 4.17. *Tabella riepilogativa con la lista dei possibili EPI trovati divisi per categoria. Il numero tra parentesi indica i composti che si potrebbero trovare escludendo i derivati.*

Sono riportati anche gli EPI testati sulla pompa d'efflusso AcrB di *Salmonella* perché questa possiede un'identità di sequenza del 94.47% rispetto l'omologa di *E. coli* e, sovrapponendo le strutture dei trasportatori proteici, il calcolo dell'RMSD indica una divergenza inferiore ai 2 Å quindi potrebbero funzionare bene anche nella pompa d'efflusso oggetto della tesi.

Per altri microrganismi, come ad esempio *Enterobacter aerogenes*, non è stata trovata la struttura tridimensionale dell'omologa pompa di efflusso nel PDB e perciò, non avendo potuto fare un confronto di sequenza e strutturale tra i trasportatori proteici, ho dovuto rinunciare a collezionare gli inibitori testati.

In alcuni lavori sono stati testati degli estratti naturali derivati da piante e non i composti purificati: non potendo discriminare l'attività esclusiva dell'EPI, rispetto altre molecole presenti nell'estratto, ho dovuto rinunciare a collezionarli.

Infine, l'attività EPI di alcuni composti è stata testata solo tramite saggi di efflusso, questi composti sono stati segnalati nella tabella riepilogativa dei risultati a pagina precedente. I composti che invece sono stati testati esclusivamente per il loro potere antibatterico (non in associazione ad antibiotici) non sono riportati.

Seguono due tabelle dove sono indicati tutti gli EPI che verranno collezionati per il *Virtual Screening*. Per ognuno è indicata la ricerca, o le ricerche, dove sono presenti i dati sperimentali che lo validano come EPI diretto contro la pompa d'efflusso AcrB di *E. coli*.

In particolare, viene quantificato l'effetto sinergico che hanno sulla MIC di *E. coli* quando sono utilizzati in associazione ad antibiotici. Le MIC sono state calcolate testando diversi antibiotici su ceppi differenti di *E. coli*, tutti comunque estrusi dalla pompa di efflusso AcrB.

EPI	**Ricerca**		**EPI**	**Ricerca**
β-amyrin	**54**		NMP	**43, 77**
A3	**16**		Norepinephrine	**61**
Amitriptyline	**5**		NSC 60339	**17**
Artesunate	**53**		Oleanolic acid	**54**
BM-19	**22**		PAβN	**7, 16, 18, 30, 38, 39, 40,**
BM-38	**22**			**41, 43, 55, 61, 77, 83**
Carvacrol	**26**		Pimozide	**44**
Cathechin	**54**		Plumbagin	**40**
CCCP	**38, 44**		Protocatechuic acid	**38**
Chlorpromazine	**5, 18, 55**		Reserpine	**32**
D13-9001	**43**		Resveratrol	**24, 28**
DHA27	**30**		Scopolamine	**38**
Diadzein	**38**		Sertraline	**50**
Epicatechin	**54**		Shikonin	**40**
Gallotannin	**39**		SLUPP-225	**17**
Lanatoside C	**38**		SLUPP-417	**17**
MBX2319	**29, 34, 41, 43**		Theobromine	**61**
MBX2931	**29**		Thioridazine	**55**
MBX3132	**29**		Thymol	**26**
MBX3135	**29**		Ursolic acid	**32**
NDGA	**40**		Uvaol	**54**

Tabelle 4.17. *Sono riportati gli EPI, che verranno collezionati nel proseguo della tesi, con indicati il numero della ricerca, o delle ricerche, dove sono presenti i dati sperimentali (**Tabella 4.16**).*

4.6 Creazione libreria EPI noti

Tramite banche dati e *servers* online ho collezionato o disegnato ogni EPI individuato nel precedente risultato della tesi. I ligandi sono stati ottenuti da banche dati online come ChEMBL, DRUGBANK Online e PubChem o disegnati *de novo* utilizzando Cactus di NIH.

I *files* dei composti ottenuti sono in formato .sdf, il quale definisce la struttura tridimensionale di una specie chimica utilizzando dei blocchi di testo che indicano gli atomi, i legami, la connettività e le coordinate.

Per ogni EPI ho controllato la stereochimica, aggiunto gli idrogeni e trasformato il formato in .pdb. Quando è stato necessario ho proceduto anche alla protonazione della molecola (utilizzando un valore di pH corrispondente a quello fisiologico) e alla minimizzazione della struttura del ligando usando USFC Chimera. L'ottimizzazione del file .pdb è stata effettuata con UCSF Chimera, facendo attenzione nel mantenere la configurazione attorno ai centri chirali dei composti.

I file .pdb sono stati poi trasformati in .pdbqt tramite il programma AutoDock e inseriti in una cartella insieme al file .pdbqt del trasportatore proteico (anche in questo esperimento è stata utilizzata la conformazione *Loose* di AcrB, quindi la subunità A di 4DX5) per essere processati nel *Virtual Screening*.

4.7 Virtual Screening degli EPI noti sul dominio Porter e analisi dei risultati

Lo *High-Throughput Virtual Screening* (HTVS) è una tecnica computazionale che permette l'identificazione di composti che mostrano maggiore affinità per un *target*, all'interno di una libreria, o banca dati, di molecole.

È stato utilizzato AutoDock Vina per valutare quali EPI, contenuti all'interno della libreria creata nel precedente risultato di tesi, risultassero più promettenti per inibire il meccanismo di efflusso di AcrB.

Il protocollo sperimentale ha previsto replica in triplice copia dell'esperimento per migliorare il risultato. La *Grid Box*, anche in questo caso, include l'intero Dominio Porter.

Segue una tabella con riportati un primo risultato del *Virtual Screening* ovvero gli EPI, ordinati dal composto con maggiore affinità a quello con minore.

Pos.	**1° replica**	**2° replica**	**3° replica**
1	Lanatoside C	Lanatoside C	Lanatoside C
2	Gallotannin	Gallotannin	Gallotannin
3	β-amyrin	D13-9001	D13-9001
4	MBX-3132	β-amyrin	β-amyrin
5	D13-9001	MBX-3132	MBX-3132
6	Oleanolic acid	MBX-3135	MBX-3135
7	Ursolic acid	Oleanolic acid	Oleanolic acid
8	Pimozide	Pimozide	Ursolic acid
9	MBX-2319	Ursolic acid	Uvaol
10	Artesunate	Uvaol	Pimozide
11	Uvaol	MBX-2319	BM-38
12	NSC60339	Reserpine	MBX-2319

13	BM-38	Artesunate	Reserpine
14	PAβN	NSC60339	NSC60339
15	MBX-2931	BM-38	BM-19
16	BM-19	BM-19	SLUPP-417
17	Reserpine	PAβN	PAβN
18	SLUPP-417	MBX-2931	Artesunate
19	MBX-3135	SLUPP-417	SLUPP-225
20	DHA27	DHA27	MBX-2931
21	SLUPP-225	SLUPP-225	Thioridazine
22	Thioridazine	Thioridazine	DHA27
23	Epicatechin	Epicatechin	Epicatechin
24	Diadzein	Catechin	Catechin
25	Amitriptyline	Diadzein	Diadzein
26	Catechin	Sertraline	Amitriptyline
27	Sertraline	Shikonin	Sertraline
28	Shikonin	NDGA	Shikonin
29	NDGA	Amitriptyline	NDGA
30	A3	Chlorpromazine	Scopolamine
31	Scopolamine	Resveratrol	Chlorpromazine
32	Chlorpromazine	A3	Resveratrol
33	Resveratrol	NMP	A3
34	NMP	Scopolamine	NMP
35	Plumbagin	Plumbagin	Plumbagin
36	CCCP	CCCP	CCCP
37	Theobromine	Theobromine	Theobromine
38	Carvacrol	Protocatechuic acid	Carvacrol
39	Protocatechuic acid	Carvacrol	Protocatechuic acid
40	Norepinephrine	Norepinephrine	Norepinephrine
41	Thymol	Thymol	Thymol

Tabella 4.18. *Risultati dei Virtual Screening ordinati dal composto con migliore affinità a quello con minore. Il celeste indica che si è ottenuta la stessa posizione in tutte le repliche.*

In generale, già da questa prima visualizzazione dei risultati possiamo dire che l'esperimento di *Virtual Screening* ha dato buoni risultati ed è riproducibile

perché le stesse molecole si posizionano circa nella stessa posizione in tutte le repliche.

Segue un'analisi più approfondita dei risultati nelle pagine successive.

VINA ha calcolato 10 pose in ogni replica per ciascun EPI per un totale di 1230 pose che sono andato a visualizzare e analizzare nel dettaglio.

Avendo perfezionato la mappatura di tre siti di legame della pompa d'efflusso AcrB ero interessato a vedere se gli inibitori vi si disponessero all'interno e, nel caso lo facessero, con quale frequenza e affinità di legame.

Riporto una tabella riepilogativa dei residui mappati nei precedenti esperimenti del mio lavoro di tesi.

Sito di legame	**Amminoacidi presenti**	**N°**
Deep binding pocket	F136 – V139 – F178 – I277 – A279 – Y327 – M573 – F610 – V612 – F615 – F617 – F628	12
Sito d'inibizione	S562 – F563 – L564 – D566 – A670 – L674 – A677 – T837 – M862 – E866	10
Sito vestibolare	V32 – A33 – Q34 – Y35 – P36 – T37 – I38 – A39 – N298 – A299 – L300 – V333 – P669 – I671 – V672 – E673	16

Tabella 4.19. *Elenco degli amminoacidi presenti nei diversi siti di legame.*

Ho quindi evidenziato i siti di legame nel Dominio Porter di AcrB e visualizzato le pose e se vi cadessero all'interno.

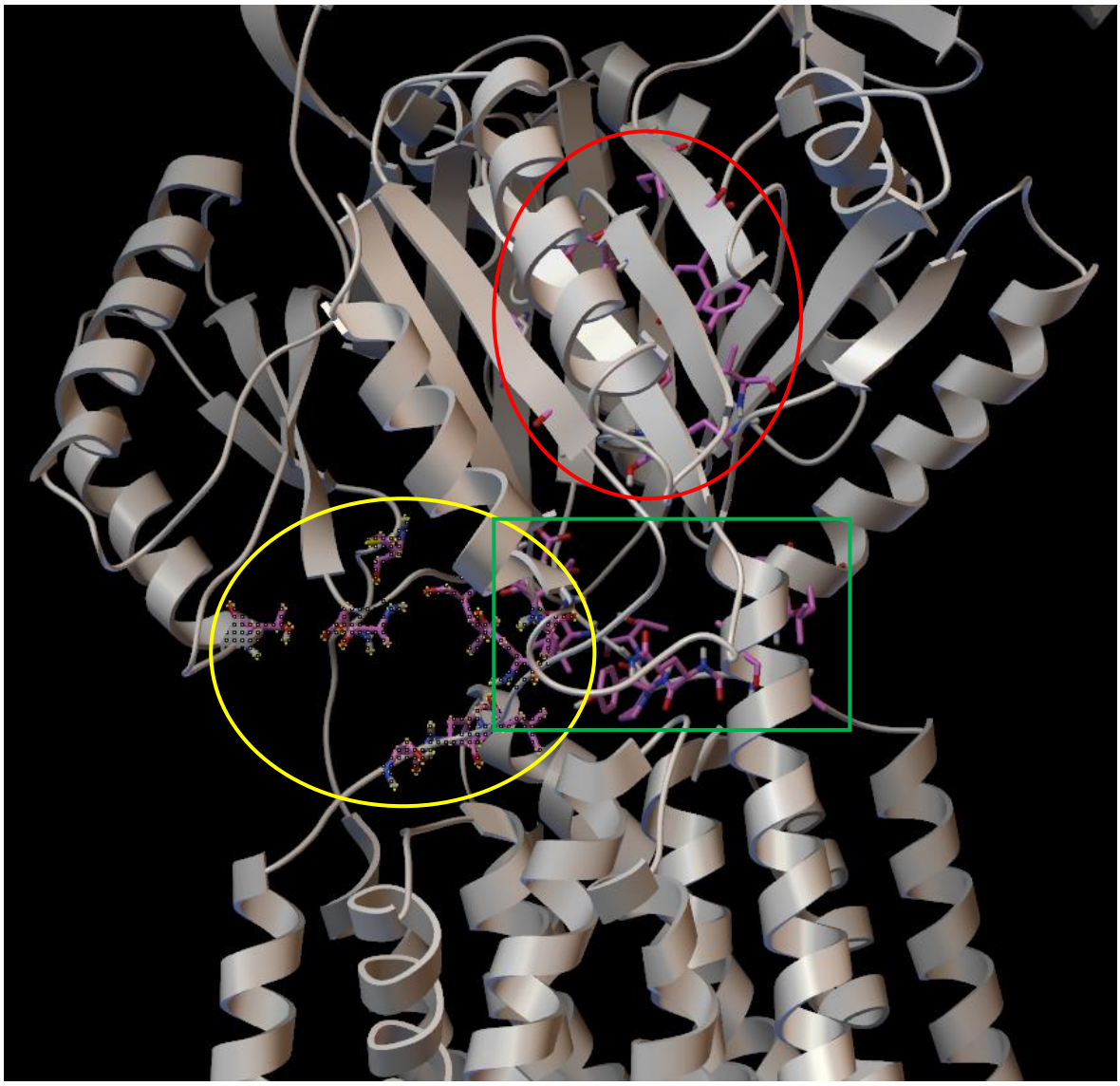


Figura 4.16. *Per gli amminoacidi che compongono i vari siti di legame sono visibili atomi e legami sovrapposti al Ribbon della struttura. (da AutoDock).*

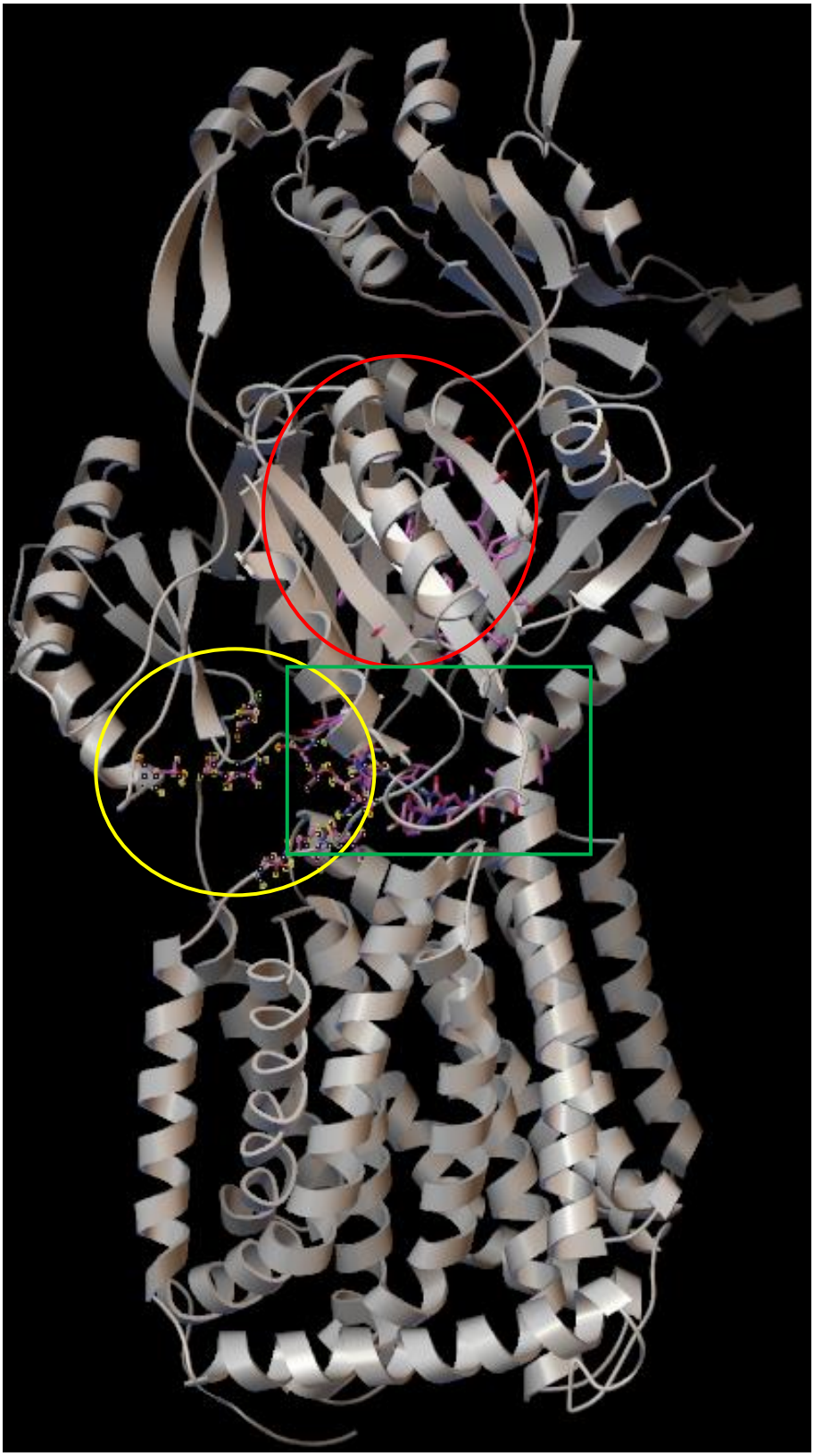


Figura 4.17. *Diversa angolatura della conformazione Loose di AcrB dove si vede l'intera catena. Per la legenda vedere didascalia della* ***Figura 4.17****.*

EPI	***Deep binding pocket***	***Sito d'inibizione***	***Sito vestibolare***
Lanatoside C	-11.5	–	–
Gallotannin	–	–	-10.4
D13-9001	-9.4	–	-10
β-amyrin	-9.8	–	-10.1
MBX-3132	-8.5	–	-9.8
MBX-3135	-8.4	–	-9.7
Oleanolic acid	–	–	-9.6
Pimozide	–	–	-9.5
Ursolic acid	-9.4	–	-9.5
Uvaol	-9.1	–	-9.5
MBX-2319	–	–	-9.2
Reserpine	-8.9	–	–
Artesunate	–	–	-9.2
NSC60339	-9.2	–	–
BM-38	–	–	-8.4
BM-19	-8.4	–	-8.7
PAβN	–	–	-8.6
MBX-2931	–	–	-8.5
SLUPP-417	-8	–	-7.8
DHA27	–	–	-8.3
SLUPP-225	-7.5	–	-7.8
Thioridazine	–	–	-8
Epicatechin	–	-7.3	-7.6
Catechin	-7.5	-7.5	-7.7
Diadzein	–	-6.9	-7.7
Sertraline	–	–	-7.6
Shikonin	–	-7.4	-7.5
NDGA	–	–	-7.6
Amitriptyline	–	–	-7.5
Chlorpromazine	–	–	-7.1
Resveratrol	-6.8	-7	-6.6
A3	–	-6.9	-6.9
NMP	-6.4	–	-6.9
Scopolamine	–	–	-6.9
Plumbagin	–	–	-6.3
CCCP	–	-5.8	-6.2
Theobromine	–	-5.5	-5.4
Protocatechuic acid	–	–	-5.5
Carvacrol	-5.6	-5.4	-5.7
Norepinephrine	–	–	-5.3
Thymol	-5.2	-5	-5.2

Tabella 4.20. *Sono riportate le $E_{BINDING}$ ($^{kcal}/_{mol}$) per le pose degli EPI che si dispongono all'interno dei rispettivi siti. È stato riportato il risultato migliore trovato osservando tutte le pose delle diverse repliche.*

Molte pose cadono nella cavità centrale di AcrB (da sopra il SDI fino al Dominio Funnel), questo perché è un Virtual Screening che potremmo definire *blind* (in maniera analoga a come sono stati descritti i *molecular docking*).

La *deep binding pocket* nella conformazione *Loose* è poco accessibile al substrato perché molto stretta e quindi le interazioni con i composti sono limitate solo a quelle molecole che mostrano grande affinità con la tasca.

Interessante notare che nel *sito d'inibizione* si dispongono principalmente EPI di origine naturale.

Il risultato più interessante si è avuto nel *sito vestibolare* che interagisce con praticamente tutti i composti e, con alcuni dei quali, ha energie di legame veramente promettenti (molto negative).

Gli EPI che hanno mostrato migliore affinità saranno analizzati dettagliatamente mediante futuri *focused docking*.

Anche il *sito vestibolare* verrà analizzato nel dettaglio perché ha mostrato ottimi risultati in questo esperimento.

CONCLUSIONI

Sono stati identificati tre possibili siti di inibizione (*deep binding pocket*, *sito d'inibizione* e *sito vestibolare*).

La berberina e i suoi derivati, specialmente il 13-(2-methylbenzyl)-berberine, hanno mostrato buone affinità con i siti di legami di AcrB negli esperimenti *in silico*.

Sono stati collezionati e testati 41 EPI noti per AcrB di *Escherichia coli* proveniente dalla letteratura disponibile su AcrB, che è stata largamente scandagliata.

5.1 Possibili ampliamenti futuri

Il *sito vestibolare* andrà analizzato maggiormente nel dettaglio in quanto si è rivelato molto promettente in AcrB.

La berberina e i suoi derivati potranno essere utilizzati in test microbiologici *in vitro* per l'inibizione della pompa d'efflusso AcrB perché l'esito degli esperimenti *in silico* è favorevole al proseguo della sperimentazione.

La ricerca bibliografica sugli EPI noti di *E. coli* potrà essere ulteriormente approfondita. Inoltre, gli EPI già collezionati potranno essere analizzati maggiormente nel dettaglio tramite nuovi esperimenti *in silico* e correlati ai dati sperimentali delle ricerche correlate e collezionate.

BIBLIOGRAFIA

AIFA. 2020. «L'uso degli antibiotici in Italia. Report nazionale 2020.»

Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. 2013. «Escherichia coli in Europe: an overview.» *International journal of environmental research and public health* 10 (12): 6235-6254.

Anes, J., McCusker, M. P., Fanning, S., & Martins, M. 2015. «The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli.» *Frontiers in microbiology* (6): 587.

Aparna, V., Dineshkumar, K., Mohanalakshmi, N., Velmurugan, D., & Hopper, W. 2014. «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 (7).

Atzori, A., Malloci, G., Cardamone, F., Bosin, A., Vargiu, A. V., & Ruggerone, P. 2020. «Molecular interactions of carbapenem antibiotics with the multidrug efflux transporter AcrB of Escherichia coli.» *International journal of molecular sciences* 21 (3): 860.

Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., & Oprea, T. I. 2016. «BDDCS, the Rule of 5 and drugability.» *Advanced drug delivery reviews* 101: 89-98.

Brandstätter, L., Sokolova, L., Eicher, T., Seeger, M. A., Briand, C., Cha, H. J., Pos, K. M. 2011. «Analysis of AcrB and AcrB/DARPin ligand complexes by LILBID MS.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808 (9): 2189-2196.

Cygan, R. T., & Kubicki, J. D. 2018. *Molecular modeling theory: Applications in the geosciences.* Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

ECDC. 2020. «Antimicrobial Resistance in the EU/EEA: A One Health Response.»

Eicher, T., Cha, H. J., Seeger, M. A., Brandstätter, L., El-Delik, J., Bohnert, J. A., & Pos, K. M. 2012. «Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (15): 5687-5692.

Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. 2019. «Progress in molecular docking.» *Quantitative Biology* 7 (2): 83-89.

Fernández, L., & Hancock, R. E. 2012. «Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance.» *Clinical microbiology reviews* 25 (4): 661-681.

Ghai, I., & Ghai, S. 2018. «Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability.» *Infection and drug resistance* 11: 523.

Gimeno, A., Ojeda-Montes, M. J., Tomás-Hernández, S., Cereto-Massagué, A., Beltrán-Debón, R., Mulero, M., & Garcia-Vallvé, S. 2019. «The light and dark sides of virtual screening: what is there to know?» *International journal of molecular sciences* 20 (6): 1375.

Giorgini, G., Mangiaterra, G., Cedraro, N., Laudadio, E., Sabbatini, G., Cantarini, M., Minnelli, C., Mobbili, G., Frangipani, E., Biavasco, F.. & Galeazzi, R. 2021. «Berberine Derivatives as Pseudomonas aeruginosa MexXY-OprM Inhibitors: Activity and In Silico Insights.» *Molecules* 26 (21).

Guvench, O., & MacKerell, A. D. 2008. «Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations.» *Molecular modeling of proteins* 63-88.

Hallam, J. C. 2022. «Intestinal pathogenic Escherichia coli: identification and characterisation of their virulence determinants.» *University of Glasgow.*

Hasan, T. H., Al-Harmoosh, R. A. 2020. «Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria.» *Sys Rev Pharm* 11 (6): 817-823.

Higgins. 2007. «Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters.» *Nature* (446): 749-757.

Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. 2004. «Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (27): 9994-9999.

Johnson, J. R., & Russo, T. A. 2002. «Extraintestinal pathogenic Escherichia coli:“the other bad E coli".» *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139 (3): 155-162.

Johnson, R. M., Fais, C., Parmar, M., Cheruvara, H., Marshall, R. L., Hesketh, S. J., & Bavro, V. N. 2020. «Cryo-EM structure and molecular dynamics analysis of the fluoroquinolone resistant mutant of the AcrB transporter from Salmonella.» *Microorganisms* 8 (6): 943.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. 2004. «Pathogenic escherichia coli. Nature reviews microbiology.» *Nature reviews microbiology* 2 (2): 123-140.

Karaosmanoglu, K., Sayar, N. A., Kurnaz, I. A., & Akbulut, B. S. 2014. «Assessment of berberine as a multi-target antimicrobial: a multi-omics study for drug discovery and repositioning.» *Omics: a journal of integrative biology* 18 (1): 42-53.

Khan, S., Hussain, A., Attar, F., Bloukh, S. H., Edis, Z., Sharifi, M., & Falahati, M. 2022. «A review of the berberine natural polysaccharide nanostructures as potential anticancer and antibacterial agents.» *Biomedicine & Pharmacotherapy* 146.

Kobylka, J., Kuth, M. S., Müller, R. T., Geertsma, E. R., & Pos, K. M. 2020. «AcrB: a mean, keen, drug efflux machine.» *Annals of the New York Academy of Sciences* 1459 (1): 38-68.

Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. 2000. «Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export.» *Nature* 405 (6789): 914-919.

Kraemer, S. A., Ramachandran, A., and Perron, G. G. 2019. «Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy.» *Microorganisms* 7 (6): 180.

Laudadio, E., Cedraro, N., Mangiaterra, G., Citterio, B., Mobbili, G., Minnelli, C., Bizzaro, D., Biavasco, F., & Galeazzi, R. 2019. «Natural alkaloid berberine activity against

Pseudomonas aeruginosa MexXY-mediated aminoglycoside resistance: In silico and in vitro studies.» *Journal of natural products* 82 (7): 1935-1944.

Leach, Andrew R. 2001. *Molecular Modelling: Principles and Applications.* Pearson Education.

Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. 2015. «The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria.» *Clinical microbiology reviews* 28 (2): 337-418.

Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M. A. Y., & Lee, V. J. 2001. «Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy.» *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45 (1): 105-116.

Morris, G. M., & Lim Wilby, M. 2008. «Molecular docking.» *Molecular modeling of proteins* 365-382.

Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., Hart, W. E., Halliday, S., Belew, R., & Olson, A. J. 2001. «AutoDock. .» *Automated docking of flexible ligands to receptor.*

Morris, G. M., Huey, R., & Olson, A. J. 2008. «Using autodock for ligand-receptor docking.» *Current protocols in bioinformatics* 24 (1): 8-14.

Munita, J. M., and Arias, C. A. 2016. «Mechanisms of Antibiotic Resistance.» *Microbiology spectrum* 4 (2).

Nikaido, H. 2018. «RND transporters in the living world.» *Research in microbiology* 169 (7-8): 363-371.

Nolivos, S., Cayron, J., Dedieu, A., Page, A., Delolme, F., & Lesterlin, C. 2019. «Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer.» *Science* 364 (6442): 778-782.

Opperman, T. J., & Nguyen, S. T. 2015. «Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition.» *Frontiers in microbiology* 6: 421.

Opperman, T. J., Kwasny, S. M., Kim, H. S., Nguyen, S. T., Houseweart, C., D'Souza, S., Bowlin, T. L. 2014. «Characterization of a novel pyranopyridine inhibitor of the AcrAB efflux pump of Escherichia coli.» *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (2): 722-733.

Ørskov, F., & Ørskov, I. 1992. « Escherichia coli serotyping and disease in man and animals.» *Canadian journal of microbiology* 699-704.

Pitout, J. D. 2008. «Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem.» *Expert review of anti-infective therapy* 6 (5): 657-669.

Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. 2018. «Antimicrobial resistance in Escherichia coli.» *Microbiology Spectrum* 6 (4).

Pos, K. M. 2009. «Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump.» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1794 (5): 782-793.

Reading, E., Ahdash, Z., Fais, C., Ricci, V., Wang-Kan, X., Grimsey, E., Politis, A. 2020. «Perturbed structural dynamics underlie inhibition and altered efflux of the multidrug resistance pump AcrB.» *Nature communications* 11 (1): 1-11.

Rosenberg, E. Y., Ma, D., & Nikaido, H. 2000. «AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump.» *Journal of bacteriology* 182 (6): 1754-1756.

Seukep, A. J., Kuete, V., Nahar, L., Sarker, S. D., & Guo, M. 2020. «Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification.» *Journal of pharmaceutical analysis* 10 (4): 277-290.

Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R. 2019. «Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside.» *The Indian journal of medical research* 149 (2): 129.

Tambat, R., Mahey, N., Chandal, N., Verma, D. K., Jangra, M., Thakur, K. G., & Nandanwar, H. 2022. «A Microbe-Derived Efflux Pump Inhibitor of the Resistance-Nodulation-Cell Division Protein Restores Antibiotic Susceptibility in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa.» *ACS Infectious Diseases* 8 (2): 255-270.

Tillhon, M., Ortiz, L. M. G., Lombardi, P., & Scovassi, A. I. 2012. «Berberine: new perspectives for old remedies.» *Biochemical pharmacology* 84 (10): 1260-1267.

Tseng, T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A., & Saier Jr, M. H. 1999. «The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins.» *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1 (1): 107-125.

Vanommeslaeghe, K., & Guvench, O. 2014. «Molecular mechanics.» *Current pharmaceutical design* 20 (20): 3281-3292.

Vargiu, A. V., Ruggerone, P., Opperman, T. J., Nguyen, S. T., & Nikaido, H. 2014. «Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of Escherichia coli AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors.» *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (10): 6224-6234.

Vieira, T. F., & Sousa, S. F. 2019. «Comparing AutoDock and Vina in ligand/decoy discrimination for virtual screening.» *Applied Sciences* 9 (21): 4538.

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. 2004. «Development and testing of a general amber force field.» *Journal of computational chemistry* 25 (9): 1157-1174.

Zgurskaya, H. I., Malloci, G., Chandar, B., Vargiu, A. V., & Ruggerone, P. 2021. «Bacterial efflux transporters' polyspecificity–a gift and a curse?» *Current Opinion in Microbiology* 61: 115-123.

Un grande ringraziamento va alla Prof.ssa Galeazzi per la sua infinita gentilezza.

Un altro grande ringraziamento va alla dottoranda Giorgia Giorgini e al Dottore di ricerca Mattia Cantarini per i loro insegnamenti.

Un ringraziamento ancora più grande voglio farlo al Dipartimento: un ambiente straordinario reso tale dalle persone *speciali* che vi lavorano. Grazie a Cristina, Elahe, Emiliano, Giovanna, Giulia, Nunzia, Pierfrancesco e Samuele.

Un immenso ringraziamento va alla mia Famiglia,
che *amo* al di sopra d'ogni cosa.

Un ultimo pensiero va a Tutte le persone *care* che ho incontrato e che mi hanno accompagnato lungo questo percorso, anche a quelle che non ci sono più. **Grazie.**

Coloro che amiamo restano dentro