

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σχέση των μεταλλάξεων U2504A και C2534T στο 23s rRNA από *Staphylococcus epidermidis* με την αντίσταση στο αντιβιοτικό λινεζολίδη.

Μελέτη με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Βασίλειος – Χρυσοβαλάντης Α. Παλιός



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σχέση των μεταλλάξεων U2504A και C2534T στο 23S rRNA από *Staphylococcus epidermidis* με την αντίσταση στο αντιβιοτικό λινεζολίδη. Μελέτη με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος Παπαδόπουλος **Λέκτωρ Βιοφυσικής**

Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μαρία Κοντού **Λέκτωρ Κλινικής Χημείας**

Συνεπιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Λεωνίδας **Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας**

Επιμέλεια: Βασίλειος – Χρυσοβαλάντης Α. Παλιός

ΛΑΡΙΣΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Σχέση των μεταλλάξεων U2504A και C2534T
στο 23s rRNA από *Staphylococcus epidermidis*
με την αντίσταση στο αντιβιοτικό λινεζολίδη.
Μελέτη με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

<i>Πρόλογος</i>	5	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ I	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1.1 Staphylococcus epidermidis	7	
1.2 Βιοσύνθεση Πρωτεϊνών	8	
1.2.1 Ριβόσωμα		
1.2.2 Στάδια πρωτεϊνοσύνθεσης		
1.3 Αντιβιοτικά	11	
1.3.1 Οξαζολιδινόνες		
1.3.2 Λινεζολίδη		
1.3.3 Μεταλαγμένα στελέχη		
1.4 Μοριακή Δυναμική	16	
1.4.1 Διαδικασία μιας προσομοίωσης		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
2.1 Στέλεχος αγρίου τύπου - wild type / Λινεζολίδη	22	
2.1.1 Τεμαχισμός		
2.1.2 Δημιουργία του αρχείου psf και pdb μαζί με τα υδρογόνα		
2.1.3 Ενυδάτωση μορίου (Solvate)		
2.1.4 Προσθήκη ιόντων (Neutralization / Add Ions)		
2.1.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Minimization)		
2.1.6 Εξισορρόπηση (Equilibration)		
2.1.8 Τελική ελαχιστοποίηση (Final Minimization)		
2.1.7 Υπολογισμός του RMSD (Calculate the Root Mean Square Deviation)		
2.2 50S με U2504A / Λινεζολίδη	27	
2.3 50S με C2534T / Λινεζολίδη	27	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	28	
<i>Βιβλιογραφία</i>	33	
<i>Παράρτημα</i>	36	
<i>Γλωσσάριο</i>	45	
<i>Ευχαριστίες</i>	48	

Τα αντιβιοτικά ανακαλύφθηκαν από τον Βρετανό επιστήμονα Flemming, ο οποίος παρατήρησε εντελώς τυχαία, πως κάποιες καλλιέργειες μικροβίων καταστρέφονταν όταν έρχονταν σε επαφή με μύκητες του γένους *Penicillium*. Την παρατήρηση αυτή ο Flemming μετέτρεψε σε επιστημονική επανάσταση. Απέδωσε την καταστροφή των μικροβιακών καλλιεργειών σε ουσίες που παράγουν οι μύκητες αυτοί. Σε λίγο καιρό, η πενικιλίνη, το πρώτο αντιβιοτικό αναδύθηκε. Τα αντιβιοτικά δίνουν λύσεις σε πολλά προβλήματα, όμως δεν είναι πανάκεια, επειδή ακριβώς δεν θεραπεύουν τα πάντα. Υπάρχουν μερικοί περιορισμοί στην χρήση τους. Όσο περισσότερο χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, τόσο περισσότερο υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης και εξάπλωσης της ανθεκτικότητας εναντίον του, με αποτέλεσμα το φάρμακο να καταστεί όλο και πιο άχρηστο.

Για να αποφευχθεί μία τέτοιου είδους ανθεκτικότητα, νέα αντιβιοτικά με παρόμοιες, αλλά όχι ταυτόσημες, χημικές ιδιότητες αναπτύχθηκαν και παρέμειναν αποτελεσματικά μέχρι να εμφανισθεί και να εξαπλωθεί η ανθεκτικότητα και σε αυτά τα νέα φάρμακα. Η σοβαρότερη συνέπεια είναι η εμφάνιση νέων βακτηριακών στελεχών που είναι ανθεκτικά σε περισσότερα αντιβιοτικά ταυτόχρονα.

Ορισμένες φορές μια μόνο μετάλλαξη στο βακτηριακό γονιδίωμα είναι αρκετή έτσι ώστε να τους δώσει αυτήν την ικανότητα. Η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου και του μικροβιακού γονιδιώματος ολοκληρώνεται σήμερα με πρωτοφανή ρυθμό. Το κλειδί για την επιτυχία στον αγώνα εναντίον της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά βρίσκεται στην εγκαθίδρυση μίας ολοκληρωμένης προσέγγισης η οποία θα μπορεί επίσης να αξιοποιήσει τις νέες δυνατότητες που προσφέρει η έρευνα του γονιδιώματος.

Η μελέτη της διπλωματικής πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, η οποία κατατάσσεται στις θεωρητικές ή υπολογιστικές μεθόδους, η ανάλυση πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν να συγκριθεί η δομή-διαμόρφωση του 23s rRNA του είδους *Staphylococcus epidermidis* αγρίου τύπου, με την 23s rRNA του ίδιου είδους με μετάλλαξη U2504A και με λινεζολίδη και τέλος του 23s rRNA του ίδιου είδους αγρίου τύπου με μετάλλαξη C2534T και με λινεζολίδη.

Όσον αφορά την διάρθρωση της παρούσας εργασίας, αρχικά θα αναφέρουμε κάποια στοιχεία που αφορούν το θεωρητικό μέρος, και εν συνέχεια θα αναφερθούμε σε πειραματικές μεθόδους, και τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μαζί με τη συζήτηση αυτών.

Μη σπαταλάς καθαρή σκέψη, σε μη καθαρή πρωτεΐνη!

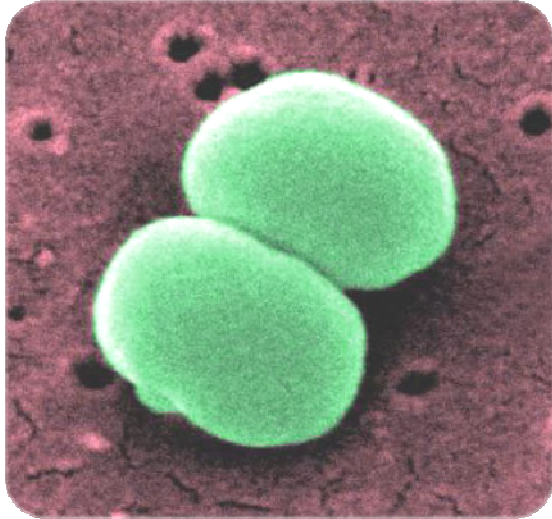
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κλινικές παρατηρήσεις του Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του Σισμανόγλειου Νοσοκομείου στην Αθήνα έδειξαν την ανθεκτικότητα έναντι του λινεζολιδίου στελεχών του *Staphylococcus Epidermidis* στα οποία εντοπίστηκαν οι σημειακές μεταλλάξεις U2504A και C2534T στην επικράτεια V του ριβοσωματικού τους RNA. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για να διερευνηθεί πιθανή σχέση της ανθεκτικότητας με τον τρόπο αλληλεπίδρασης της λινεζολίδης με την μεταλλαγμένη 50S υπομονάδα σε ατομικό επίπεδο. Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνεται να δικαιολογείται η ανθεκτικότητα της C2534T λόγω ασταθέστερης αλληλεπίδρασης της 50S με την λινεζολίδη, αλλά όχι της U2504A.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 *Staphylococcus epidermidis*



Είδος: Βακτήρια , + GRAM

Κατηγορία: Βακίλλων

Φύλο: Firmicutes

Οικογένεια: Staphylococcaceae

Γένος: Staphylococcus

Συντομογραφία: *S. epidermidis*

Το βακτήριο *Staphylococcus epidermidis* είναι ένας προαιρετικά αερόβιος οργανισμός, με gram θετικούς κόκκους, διατεταγμένους σε διπλόκοκκους (δύο κύτταρα, το ένα δίπλα στο άλλο) σχηματίζοντας μικρές έως μετρίου μεγέθους λευκές αποικίες. Το 1884, ο Rosenbach περιέγραψε δύο τύπους χρωματισμένων αποικιών των σταφυλόκοκκων και πρότεινε την κατάλληλη ονοματολογία: *Staphylococcus aureus* (χρυσοκίτρινο) και *Staphylococcus albus* (λευκό). Το τελευταίο είδος τώρα ονομάζεται *Staphylococcus epidermidis* [1].

Το *S. epidermidis* είναι ένα από τα τριάντα τρία γνωστά είδη που ανήκουν στο γένος του σταφυλόκοκκου. Αποτελεί μέρος της φυσικής χλωρίδας του ανθρώπου και μπορεί να ανιχνευθεί σε βλενογόννους μεμβράνες και στο δέρμα. Αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων [4].

Το *S. epidermidis* έχει την ικανότητα να σχηματίζει πολυστρωματικές βιομεμβράνες (biofilms) σε αδρανή αντικείμενα, όπως ενδοφλέβιους καθετήρες, προσθετικές (τεχνητές) καρδιακές βαλβίδες, αρθρώσεις και άλλες πλαστικές ιατρικές συσκευές. Όταν βρίσκονται στη μορφή αυτή δεν είναι εύκολη η διάχυση των αντιβιοτικών και το γεγονός αυτό, μαζί με την αυξημένη ανθεκτικότητα λόγω συχνής έκθεσης σε αυτά, κάνει τις λοιμώξεις πολύ δύσκολες στην αντιμετώπιση [19].

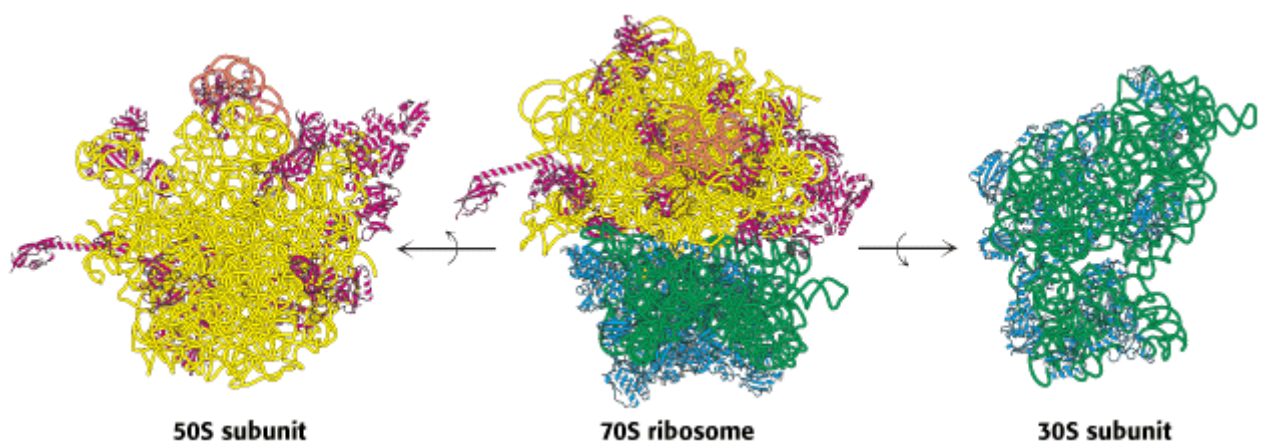
1.2 Βιοσύνθεση Πρωτεϊνών

Η πρωτεϊνοσύνθεση αποτελεί ζωτικής σημασίας συνεχή δραστηριότητα όλων των κυττάρων, για ορισμένους δε τύπους κυττάρων την κύρια λειτουργία τους. Τα κυτταρικά οργανίδια που κυρίως συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση είναι ο πυρήνας και τα ριβοσώματα [10]. Το DNA περιέχει κωδικοποιημένο το σύνολο των πληροφοριών που απαιτούνται για τη σύνθεση των αναγκαίων για κάθε κύτταρο πρωτεϊνών. Η διαδικασία λοιπόν της πρωτεϊνοσύνθεσης ξεκινά από τον πυρήνα με την μεταγραφή του DNA με τη διαδικασία της σύνθεσης του ειδικού συμπληρωματικού μορίου, του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Στη συνέχεια το μόριο του mRNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και συνδέεται με τα ριβοσώματα, τα οποία αποτελούν την έδρα της πρωτεϊνοσύνθεσης.

1.2.1 Ριβόσωμα

Τα ριβοσώματα είναι μικρά, ηλεκτρονιοπυκνωτικά σωματίδια, τα οποία προσδίδουν ένα κυανό χρώμα (βασεοφιλία) στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που παράγουν πρωτεΐνες, κατά την παρατήρηση με το οπτικό μικροσκόπιο. Στους προκαρυώτες κάθε ριβόσωμα συγκροτείται από μια μικρή υπομονάδα μεγέθους 30S (μονάδες Svedberg) και μια μεγάλη υπομονάδα 50S, και σχηματίζουν ολοκληρωμένα ριβοσώματα των 70S. Κάθε υπομονάδα συνιστά ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό

σύμπλοκο, αποτελούμενο από ειδικά ριβοσωματικά μόρια RNA (rRNA) και ριβοσωματικές πρωτεΐνες. Η υπομονάδα 30S περιέχει 16S rRNA και περίπου 21 πρωτεΐνες, ενώ η υπομονάδα 50S περιέχει 5S rRNA και 23S και περίπου 34 πρωτεΐνες [27]. Επιπροσθέτως, το ριβόσωμα είναι μια δυναμική δομή που αλληλεπιδρά με πολλές άλλες πρωτεΐνες στο κύτταρο. Υπάρχουν πρωτεϊνικοί παράγοντες που είναι απολύτως απαραίτητοι για τη ριβοσωματική λειτουργία και αλληλεπιδρούν με το ριβόσωμα, αλλά δεν θεωρούνται «ριβοσωματικές πρωτεΐνες»[13].



Εικόνα 1. Μοντέλα ριβοσώματος 70S καθώς και των υπομονάδων 50S και 30S. Το 23S RNA αναπαρίσταται ως κίτρινο, το 5S RNA ως πορτοκαλί, το 30S RNA ως πράσινο και οι πρωτεΐνες των υπομονάδων 50S και 30S, κόκκινες και μπλέ αντίστοιχα [27].

1.2.2 Στάδια πρωτεϊνοσύνθεσης

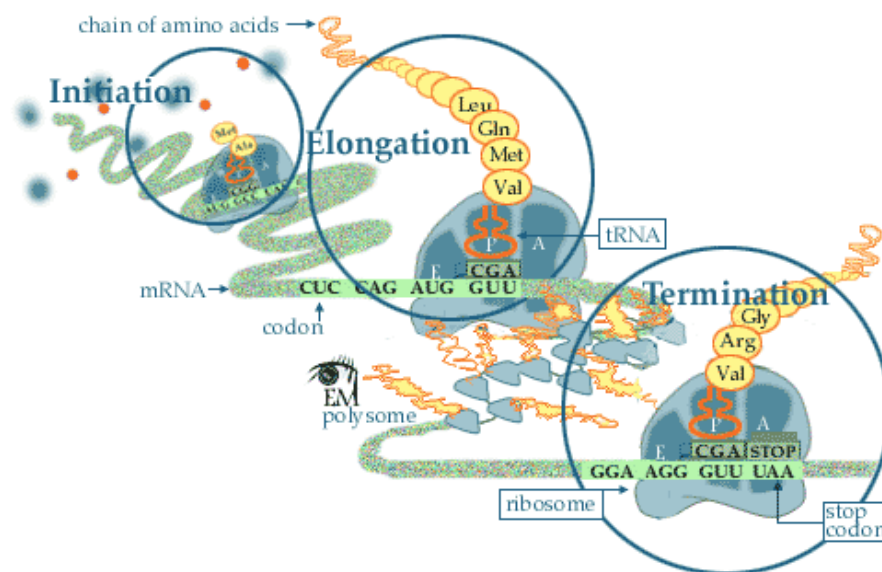
Η καθαυτό σύνθεση των πρωτεϊνών επιτελείται στο πλαίσιο ενός περίπλοκου κύκλου, στον οποίο τα διάφορα ριβοσωματικά μακρομόρια διαδραματίζουν εξειδικευμένους ρόλους [10]. Μολονότι η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μια συνεχής διαδικασία, μπορεί κανείς να τη διαχωρίσει σε έναν αριθμό διακριτών σταδίων [1]: **α) Εκκίνηση, β) Επιμήκυνση, και γ) Τερματισμός-Απελευθέρωση.** Για την απλούστερη παρουσίαση της διαδικασίας, έχουν παραλειφθεί οι παράγοντες εκκίνησης, επιμήκυνσης και τερματισμού [13].

Εκκίνηση: Η εκκίνηση ξεκινά πάντοτε με μια ελεύθερη ριβοσωματική υπομονάδα 30S με την πρόσδεση ενός mRNA, δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο εκκίνησης που περιέχει και το πρώτο αμινοάκυλο-tRNA. Στο στάδιο αυτό απαιτείται η παρουσία τριφωσφορικής γουανοσίνης. Έπειτα, προστίθεται μια ριβοσωματική υπομονάδα 50S και σχηματίζεται το ενεργό ριβόσωμα 70S. Μετά το πέρας της μεταφραστικής διαδικασίας, το ριβόσωμα απελευθερώνεται και διίσταται πάλι σε δύο υπομονάδες μια των 30S και άλλη μια των 50S. Ειδικότερα, η σύνθεση των πρωτεϊνών αρχίζει με την αλληλεπίδραση της υπομονάδας 30S και του mRNA διαμέσου της αλληλουχίας Shine-Dalgarno (αλληλουχία μήκους 3 έως 9 νουκλεοτιδίων, που βρίσκεται στο 5' άκρο του mRNA). Η εκκίνηση αρχίζει πάντοτε με ένα ειδικό εναρκτήριο αμινοακυλο-tRNA, που δεσμεύεται στο κωδικόνιο έναρξης, το AUG. Στα βακτήρια, το ειδικό αυτό μόριο είναι το tRNA της φόρμυλομεθειονίνης. Στη συνέχεια η φορμυλομάδα απομακρύνεται από το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου, επομένως το ακραίο αμινοξύ μιας ολοκληρωμένης πρωτεΐνης είναι πάντοτε μια μεθειονίνη [28].

Επιμήκυνση: Το mRNA ελίσσεται δια μέσου του ριβοσώματος, δεσμευμένο πρωτίστως με την υπομονάδα 30S. Το ριβόσωμα διαθέτει άλλες θέσεις αλληλεπίδρασης με τα μόρια των tRNA. Οι θέσεις αυτές εδράζονται κατά κύριο λόγο στην υπομονάδα 50S και ονομάζονται θέση P, και θέση A. Η θέση A, η θέση δέκτης, είναι η θέση στην οποία δεσμεύεται πρώτα το νεοεισερχόμενο AA- tRNA. Η θέση P, η θέση του πεπτιδίου (ή πεπτιδυλο-θέση), είναι η θέση στην οποία συγκρατείται το επιμηκυνόμενο πεπτίδιο από ένα μόριο tRNA. Κατά τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού το πεπτιδικό κατάλοιπο μετακινείται προς το tRNA στη θέση A, καθώς σχηματίζεται ένας νέος πεπτιδικός δεσμός. Το μόριο tRNA που συγκρατεί το πεπτίδιο πρέπει τώρα να μετατοπιστεί από τη θέση A στη θέση P, απελευθερώνοντας έτσι τη θέση A για ένα άλλο AA-tRNA. Σε κάθε βήμα μετατόπισης εκτίθεται ένα νέο κωδικόνιο στη θέση

Α του ριβοσώματος. Το ριβόσωμα πρέπει να μετακινηθεί κατά ένα ακριβώς κωδικόνιο σε κάθε βήμα [28].

Τερματισμός-Απελευθέρωση: Ο τερματισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης συντελείται όταν το ριβόσωμα αφιχθεί σε ένα κωδικόνιο που δεν ορίζει κάποιο AA-tRNA, δηλαδή σε ένα κωδικόνιο τερματισμού UAA, UAG, και UGA. Κανένα tRNA δεν δεσμεύεται σε κωδικόνιο τερματισμού, αντίθετα ορισμένες πρωτεΐνες (παράγοντες απελευθέρωσης ή τερματισμού) αναγνωρίζουν το σήμα τερματισμού της αλυσίδας και αποκολλούν το προσδεσμένο πολυπεπτίδιο από το τελικό tRNA, απελευθερώνοντας την πλήρη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, το ριβόσωμα διίσταται και οι δύο υπομονάδες του είναι ελεύθερες να συγκροτήσουν νέα σύμπλοκα εκκίνησης [28].



Εικόνα 2. Πρωτεϊνοσύνθεση: α) Εκκίνηση, β) Επιμήνυση, γ) Τερματισμός-Απελευθέρωση [28].

1.3 Αντιβιοτικά

Ένα αντιβιοτικό είναι μια ουσία ή ένωση που 'σκοτώνει' τα βακτηρίδια ή εμποδίζει την ανάπτυξή τους. Τα αντιβιοτικά ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των αντιμικροβιακών ουσιών, που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων και

των πρωτόζωων. Ο όρος επινοήθηκε από τον Selman Waksman το 1942 για να περιγράψει κάθε ουσία που παράγεται από μικροοργανισμούς, η οποία είναι ανταγωνιστική ως προς την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Πολλά αντιβιοτικά είναι σχετικά μικρά μόρια με ένα μοριακό βάρος λιγότερο από 2000 Da. Συνήθως κατατάσσονται με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, τη χημική δομή, ή το φάσμα της δραστηριότητάς τους [20]. Τα περισσότερα αντιβιοτικά έχουν ως στόχο τις βακτηριακές λειτουργίες και τις διαδικασίες ανάπτυξης. Τα αντιβιοτικά με στόχο το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες), ή την κυτταρική μεμβράνη (πολυμυξίνες), ή αυτά που εμποδίζουν τα απαραίτητα βακτηριακά ένζυμα (κινολόνες, σουλφοναμίδες), καλούνται βακτηριοκτόνα. Εκείνα τα οποία έχουν την πρωτεϊνοσύνθεση ως στόχο (αμινογλυκοσίδες, μακρολίδια και τετρακυκλίνες), καλούνται βακτηριοστατικά. Περαιτέρω κατάταξη σε κατηγορίες σε συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων, όπως είναι Gram-αρνητικά ή Gram-θετικά βακτήρια. Κατά τα τελευταία λίγα χρόνια, τρεις νέες κατηγορίες αντιβιοτικών, κυκλικά λιποπεπτίδια (δαπτομυκίνη), γλυκοκυκλίνες (tigecycline), και οξαζολιδινόνες (λινεζολίδη), έχουν τεθεί σε κλινική χρήση. Η tigecycline είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό, ενώ οι δύο άλλες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά Gram-θετικών λοιμώξεων [20].

1.3.1 Οξαζολιδινόνες

Το 1978, οι οξαζολιδινόνες περιγράφηκαν για πρώτη φορά για τη χρησιμότητά τους για την αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών. Ωστόσο οι αντιβακτηριακές τους ιδιότητες ανακαλύφθηκαν έξι χρόνια αργότερα το 1987, με τις οξαζολιδινόνες Dup 721 και DuP 105, εξαιτίας όμως της τοξικότητάς τους σταμάτησε η ανάπτυξη των δύο αυτών παραγόντων [3]. Αξίζει να υπογραμμιστεί, ότι οι οξαζολιδινόνες είναι τα μόνα νέα αντιβιοτικά που έχουν ανακαλυφθεί και εφαρμοστεί με επιτυχία τα τελευταία 40 χρόνια. Διαθέτουν έντονη δράση εναντίον των Gram θετικών βακτηρίων. Δρουν κυρίως βακτηριοστατικά εναντίον των γενών *Staphylococcus* και *Enterococcus* και βακτηριοκτόνα εναντίον των

περισσότερων ειδών του γένους *Streptococcus*. Σε αντίθεση με τα Gram θετικά βακτήρια, είναι λιγότερο ενεργές έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων [4].

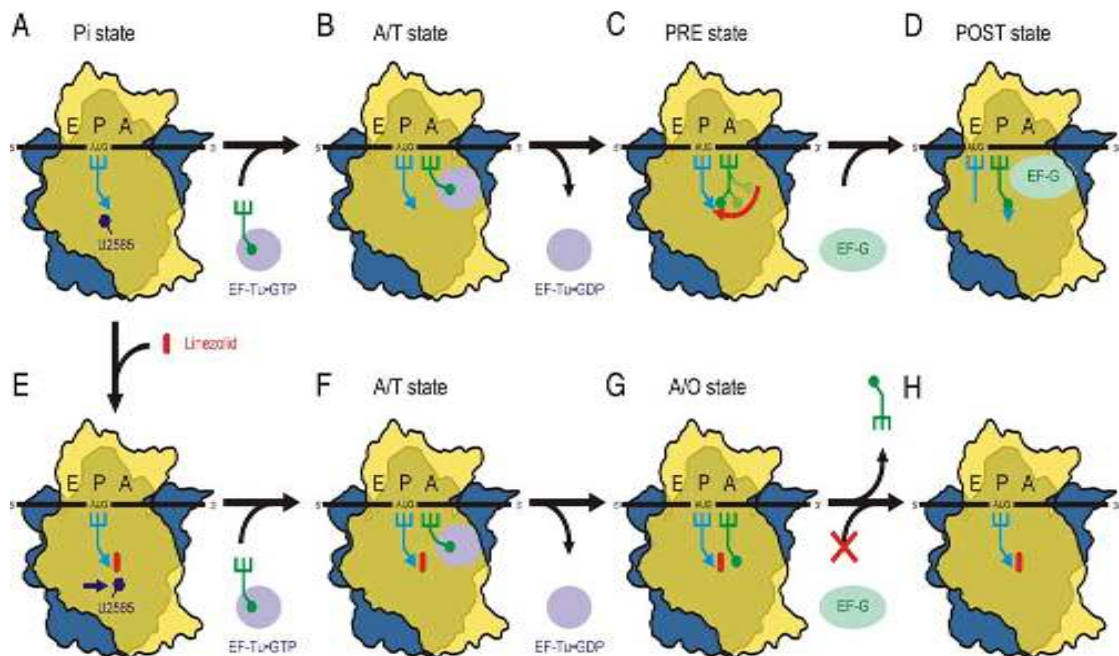
1.3.2 Λινεζολίδη

Η σταδιακή αύξηση των λοιμώξεων που οφείλονται σε Gram θετικούς κόκκους και Gram αρνητικούς βάκιλλους αλλά και η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών ευρέους φάσματος οδήγησαν στην εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών, συνεπώς η χρήση ενός ισχυρού και 'αφθαρτού' αντιβιοτικού ήταν επιτακτική [2]. Αποτελεί τον πρώτο εγκεκριμένο αντιμικροβιακό παράγοντα για τη θεραπεία λοιμώξεων προκαλούμενων από MRSA και VRE. Η λινεζολίδη (μη τοξική) ανακαλύθηκε το 1996 από την Upjohn Laboratories, ως παράγωγο της μορφολίνης. Είναι εμπειρικά γνωστή ως (S)-N-[[3-[3-φθορο-4-μορφολινυλοφαινυλο]-2-οξο-5-οξαζολιδινυλο]μεθυλο]ακεταμίδη με μοριακό τύπο $C_{16}H_{20}FN_3O_4$ και M.B. 337.35 [12]. Εγκρίθηκε για χρήση τον Απρίλιο του 2000 από τον FDA των Η.Π.Α., έπειτα στον Καναδά και τη Νότια Αμερική. Τον Φεβρουάριο του 2001 εγκρίθηκε από την Ελβετία, το Ηνωμένο Βασίλειο και άλλες μη Ευρωπαϊκές χώρες [11]. Ενώ τα περισσότερα από τα ευρέως γνωστά αντιβιοτικά (μακρολίδες, χλωραμφαινικόλη) αναστέλλουν τις βακτηριακές πρωτεΐνες στο στάδιο της επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η λινεζολίδη επεμβαίνει πιο νωρίς, αλληλεπιδρώντας ισχυρά με τη επικράτεια V του 23S rRNA της 50S ριβοσωμικής υπομονάδας. Στο στάδιο της εκκίνησης της βακτηριακής μετάφρασης, η 50S υπομονάδα συνδέεται με fMet-tRNA και ένα σύμπλοκο (έναρξης) που αποτελείται από την 30S ριβοσωματική υπομονάδα και το mRNA, αποτελούν το λειτουργικό συγκρότημα έναρξης της διαδικασίας. Η ενεργότητα του ριβοσώματος, γνωστή και με το όνομα πεπτιδυλο-τρανσφεράση (PTase) εντοπίζεται στη μεγάλη ριβοσωματική υπομονάδα, και συγκεκριμένα στην V περιοχή του 23S rRNA και πλησίον αυτής. Η λινεζολίδη αλληλεπιδρά με το πεπτιδυλο-tRNA το οποίο δεσμεύεται στη θέση P της 50S υπομονάδας [26]. Αυτή η αλληλεπίδραση παρεμποδίζει την δέσμευση του fMet-tRNA σε αυτή τη θέση κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου για την εκκίνηση [30]. Η αντιμικροβιακή της δράση οφείλεται στην υδροξυακετυλική ομάδα που είναι προσαρτημένη στο ετεροκυκλικό άζωτο [29], ενώ η αυξημένη δραστηριότητά της οφείλεται στην

ύπαρξη του φθορίου ως υποκαταστάτη στην 3 φαινυλική θέση, τόσο *in vitro* όσο *in vivo*.



Εικόνα 3. Χημική δομή της λινεζολίδης [29].

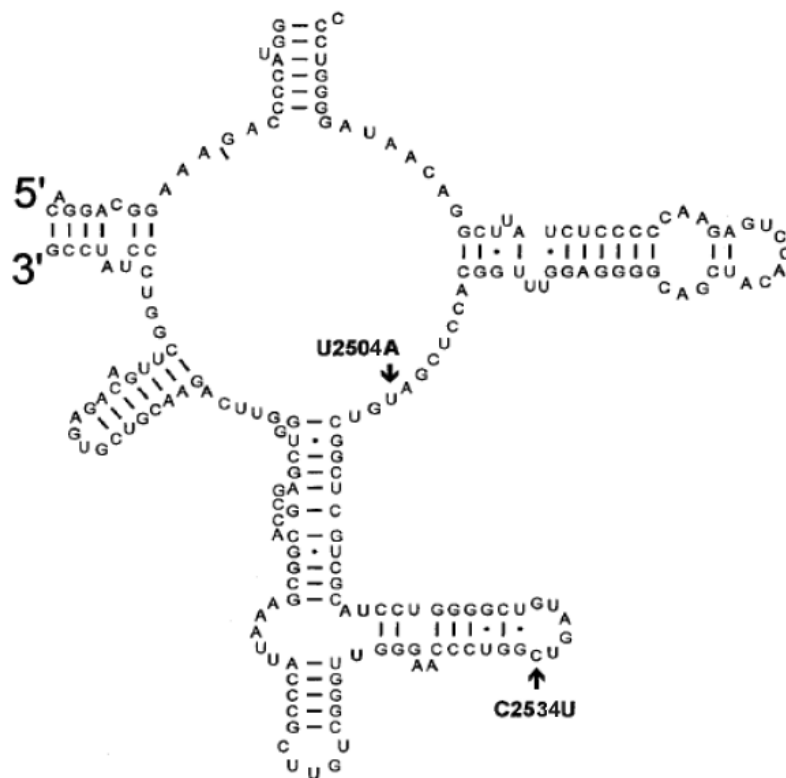


Εικόνα 4. A-D φυσιολογική μετάφραση σε στέλεχος αγρίου τύπου, E-H δράση λινεζολίδης σε στέλεχος αγρίου τύπου [30].

1.3.3 Μεταλλαγμένα στελέχη

Από τα αποτελέσματα πολυμορφισμών της περιοχής V του γονιδίου που ενοχοποιούνται για την ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης προέκυψαν τρεις μεταλλάξεις, η G2576T, η C2534T και η U2504A, βάσει της αρίθμησης του γονιδίου του 23S rRNA του *E.coli* [31]. Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη για τις μεταλλάξεις C2534U και U2504A. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν

εντοπίζονται σε νουκλεοτίδια τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα με τη λινεζολίδη, αλλά παρουσιάζονται σε νουκλεοτίδια παρακείμενα της ομάδας των εξαιρετικά συντηρημένων νουκλεοτιδίων [25], που αποτελούν τη θέση πρόσδεσής της, και διαδραματίζουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο είτε στην πεπτιδυλομεταφορά είτε στην υδρόλυση του πεπτιδυλο – tRNA [25, 22]. Ο συνηθέστερος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα στην λινεζολίδη, είναι ο αυξημένος αριθμός των μεταλλαγμένων αντιγράφων με σημειακές μεταλλάξεις στον κεντρικό βρόγχο της επικράτειας V του 23S rRNA [15]. Είναι όμως σκόπιμο να εξετασθεί η ευστάθεια των συμπλόκων της λινεζολίδης με τα μεταλλάγματα (50S υπομονάδες) που φέρουν τις εξεταζόμενες μεταλλάξεις, σε σχέση με αυτήν του συμπλόκου της με την αγρίου τύπου 50S, προκειμένου να διαπιστωθεί ενδεχόμενη σχέση με την ανθεκτικότητα του *S.epidermidis*. Επίσης είναι ενδιαφέρον να διερευνηθεί, το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων στην διαμόρφωση του θύλακα υποδοχής της λινεζολίδης. Αυτά μπορούν να μελετηθούν με τη βοήθεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής (ΠΜΔ).



Εικόνα 5. Μεταλλάξεις : C2534T, U2504A στο 23S rRNA του *E.coli* [31].

1.4 Μοριακή Δυναμική

Μία από τις θεωρητικές μεθόδους με τις οποίες μπορούμε να μελετήσουμε πρωτεΐνες, και γενικότερα μακρομόρια, είναι οι ΠΜΔ (Molecular Dynamics Simulations). Όπως υποδηλώνει και το όνομα, ουσιαστικά πραγματοποιείται μία προσομοίωση των μεταβολών των ιδιοτήτων (θέσεις ατόμων, ταχύτητες, κτλ.) ενός μοριακού συστήματος, ως συνάρτηση του χρόνου.

Ένα πρόγραμμα ΠΜΔ, χρησιμοποιεί μια συνάρτηση ολικής δυναμικής ενέργειας και υπολογίζει από τις τρέχουσες συντεταγμένες των ατόμων σε κάθε βήμα της προσομοίωσης και για κάθε άτομο, την συνισταμένη δύναμη που ασκείται πάνω του. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις και ακολούθως οι νέες θέσεις και ταχύτητες για χρονικό βήμα Δt .

Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα ανάλογα με το πείραμα του ερευνητή. Οι ΠΜΔ έγιναν δυνατές χάρη στην ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Ουσιαστικά, όλη η εργασία γίνεται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Οι προσομοιώσεις που εκτελούνται στον υπολογιστή, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ μικροσκοπικών μεγεθών και χρονικών κλιμάκων και του μακροσκοπικού κόσμου του εργαστηρίου [16]. Επίσης, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος. Η Μοριακή Δυναμική σχετίζεται με διαδικασίες που εξαρτώνται από τον χρόνο και που λαμβάνουν χώρα σε μοριακά συστήματα [8]. Κάθε δυναμική διεργασία (π.χ. κίνηση) έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος, καθώς και ένα ενεργειακό εύρος. Τα μακρομόρια, και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες, εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος χαρακτηριστικών κινήσεων, από τις ατομικές ταλαντώσεις που είναι πολύ γρήγορες (fs) και πολύ εντοπισμένες, έως τις αργές κινήσεις (μs - ms) που γίνονται στην κλίμακα ολόκληρου του μορίου, όπως μία αναδίπλωση για παράδειγμα. Αρκετές από αυτές τις κινήσεις, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης [8].

Όπως γίνεται αντιληπτό, τα άτομα ενός βιομορίου δέχονται ένα σύνολο δυνάμεων λόγω της θέσης τους, για τον υπολογισμό των οποίων χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν το δυναμικό συναρτήσει της θέσης (συναρτήσεις ολικής δυναμικής ενέργειας ή

force fields), όπως είναι το AMBER και το CHARMM. Στις προσομοιώσεις της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση ολικής δυναμικής ενέργειας CHARMM, όπως θα δούμε πιο αναλυτικά παρακάτω. Μια μαθηματική συνάρτηση ολικής δυναμικής ενέργειας, περιλαμβάνει εξισώσεις που περιγράφουν την μεταβολή της δυναμικής ενέργειας που οφείλεται: α) σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό [32, 33] και β) σε αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό [34].

Παρακάτω παρουσιάζονται οι εξισώσεις για τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals (1), τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις Coulomb (2) και τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις (3):

$$v^{\text{LJ}}(r) = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (1)$$

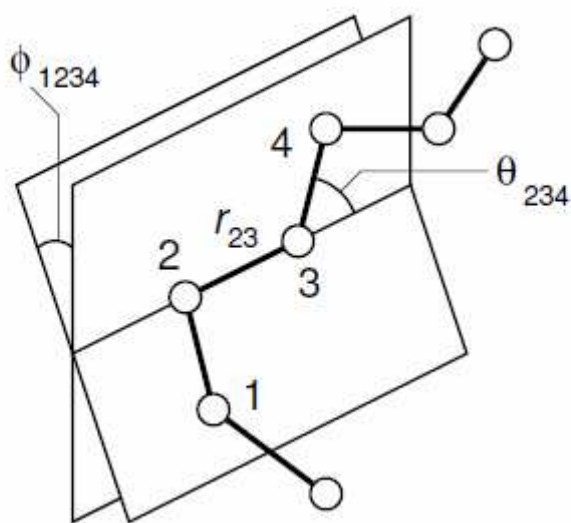
Το δυναμικό (1) καλείται δυναμικό Lennard-Jones. Το σ είναι η απόσταση κατά την οποία η δυναμική ενέργεια μεταξύ δύο ατόμων είναι μηδέν. Το ε έχει διαστάσεις ενέργειας. Το r είναι η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων [32].

$$v^{\text{Coulomb}}(r) = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (2)$$

Q_1 και Q_2 είναι τα φορτία δύο ατόμων, το r είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων, ενώ το ϵ_0 είναι η ηλεκτρική διαπερατότητα του κενού και το π είναι η γνωστή σταθερά που ισούται με 3,14 [33].

$$\begin{aligned} U_{\text{intramolecular}} = & \frac{1}{2} \sum_{\text{bonds}} k_{ij}^r (r_{ij} - r_{\text{eq}})^2 \\ & + \frac{1}{2} \sum_{\text{bend angles}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{\text{eq}})^2 \\ & + \frac{1}{2} \sum_{\text{torsion angles}} \sum_m k_{ijkl}^{\phi, m} (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m)) \end{aligned} \quad (3)$$

Η εξίσωση αυτή περιγράφει την δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Το δυναμικό αυτό αποτελείται από τρεις όρους: Ο πρώτος όρος περιγράφει την δυναμική ενέργεια λόγω απομάκρυνσης των ατόμων από την θέση ισορροπίας σε ομοιοπολικό δεσμό. Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στην δυναμική ενέργεια λόγω κάμψεων (Εικόνα 6) και ο τρίτος στην δυναμική ενέργεια λόγω στρέψεων [16, 34].



Εικόνα 6. Αναπαράσταση των γωνιών που σχηματίζονται σε ένα απλουστευμένο σύστημα επτά ατόμων που συνδέονται το ένα με το άλλο [35]. Η απόσταση r_{23} συμβολίζει την απόσταση μεταξύ των ατόμων 2 και 3, τα οποία είναι συνδεδεμένα με χημικό δεσμό [16]. Η γωνία θ_{234} συμβολίζει των γωνία μεταξύ των φορέων 2 διαδοχικών χημικών δεσμών. Τέλος, η γωνία ϕ_{1234} συμβολίζει την γωνία στρέψης [35].

Οι σταθερές των εξισώσεων 1,2 και 3, που αφορούν ζεύγη ατόμων, λέγονται παράμετροι της συνάρτησης ολικής δυναμικής ενέργειας (force field) και θα πρέπει να είναι γνωστές για το υπό μελέτη μοριακό σύστημα προκειμένου να εφαρμοστούν οι ΠΜΔ.

Συνοψίζοντας λοιπόν, ένα πρόγραμμα ΠΜΔ χρησιμοποιεί μια συνάρτηση δυναμικού και υπολογίζει από τις τρέχουσες συντεταγμένες των ατόμων σε κάθε βήμα της προσομοίωσης και για κάθε άτομο, την συνισταμένη δύναμη που ασκείται πάνω του. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις και ακολούθως οι νέες θέσεις και ταχύτητες για χρονικό βήμα Δt (συνήθως 2 fs). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα.

1.4.1 Διαδικασία μιας προσομοίωσης

Η διαδικασία μιας προσομοίωσης περιλαμβάνει εν συντομία τα εξής βήματα [18, 8]:

Προετοιμασία συστήματος: Τεμαχισμός του αρχείου συντεταγμένων pdb ενός συμπλόκου στα επιμέρους συστατικά του (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, H₂O κλπ) και ακολούθως ανασύνθεσή του με τη βοήθεια του προγράμματος psfgen, προκειμένου να δημιουργηθεί το αρχείο τοπολογίας psf και το αρχείο συντεταγμένων των ατόμων pdb μαζί με τα υδρογόνα.

Διαλυτοποίηση: Προσθήκη μορίων νερού για να διαλυτοποιήσουν το μόριο.

Προσθήκη ιόντων: Προσθήκη ιόντων στο σύστημα νερού-μορίου, ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η ηλεκτρική ουδετερότητα του συστήματος.

Ελαχιστοποίηση: Πριν από την έναρξη του κυρίως βήματος, της εξισορρόπησης, πρέπει να προηγηθεί μία ελαχιστοποίηση ενέργειας, κατά την οποία το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις, αναζητά στην ενέργεια του συστήματος ένα τοπικό ελάχιστο μεταβάλλοντας σταδιακά τις θέσεις των ατόμων και υπολογίζοντας την ενέργεια.

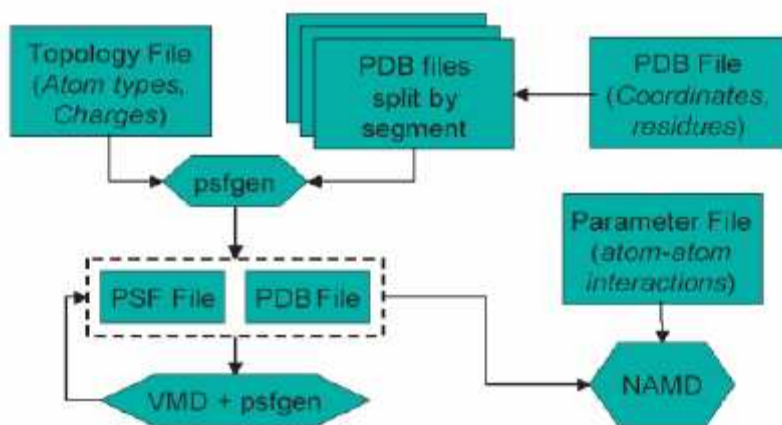
Εξισορρόπηση: Ο σκοπός αυτής της φάσης είναι να σταθεροποιηθούν αναφορικά με το χρόνο, διάφορες ιδιότητες του συστήματος (ανάλογα με το στατιστικό σύνολο που επιλέγουμε) όπως η ενέργεια, η θερμοκρασία, και η πίεση.

Υπολογισμός του RMSD: Μια από τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της μεταβολής της δομής σε σχέση με την αρχική δομή συναρτήσει του χρόνου, είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης, RMSD (Root Mean Square Deviation).

$$RMSD_j = \sqrt{\frac{\sum_i (r_{0i} - r_{ij})^2}{N}} \quad (4)$$

Το r_{0i} είναι το αρχικό διάνυσμα θέσης του ατόμου i , r_{ij} είναι το διάνυσμα θέσης του ατόμου i στο βήμα j και N είναι το πλήθος των ατόμων του συστήματος. Μπορούμε σε ένα διάγραμμα, να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης. Για να θεωρήσουμε ότι η εξισορρόπηση έχει φτάσει σε ένα ικανοποιητικό σημείο, η μεταβολή του RMSD θα πρέπει να έχει φθάσει σε ένα πλατό.

Το πρόγραμμα που εκτελεί την προσομοίωση, αποθηκεύει ανά τακτά χρονικά διαστήματα τις συντεταγμένες και τις ταχύτητες των ατόμων του συστήματος, όπως αυτές μεταβάλλονται με τον χρόνο.



Εικόνα 7. Διάγραμμα ροής που δείχνει τον τρόπο χρήσης των διαφόρων αρχείων από τα προγράμματα VMD και NAMD.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 7, το πρόγραμμα NAMD είναι ο τελικός προορισμός, είναι δηλαδή το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις. Το parameter file, δηλαδή το αρχείο παραμέτρων, είναι ένα αρχείο που περιέχει τις σταθερές της συνάρτησης δυναμικού για κάθε τύπο ατόμου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το αρχείο παραμέτρων `par_all27_prot_na.inp` για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα τροποποιημένο, έτσι ώστε να περιλαμβάνει τις παραμέτρους για την λινεζολίδη. Αυτές οι παράμετροι υπολογίστηκαν από την κα Μαρία Τζιαστούδη στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής της εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το πειραματικό μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, η οποία κατατάσσεται στις θεωρητικές ή υπολογιστικές μεθόδους, η ανάλυση δηλαδή πραγματοποιείται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Λόγω έλλειψης συντεταγμένων για την 50S ριβοσωματική υπομονάδα από *S. epidermidis* μελετήθηκε, η 50S του συγγενικού είδους *E.coli* κατόπιν ενσωμάτωσης σ' αυτήν της λινεζολίδης, της οποίας η 3Δ δομή είναι γνωστή στην ενσωματωμένη της διαμόρφωση στην 50S του *Haloarcula Marismortui* (3CPW.pdb). Τρέξαμε τρεις σειρές προσομοιώσεων με ενσωματωμένη λινεζολίδη, α) στην αγρίου τύπου 50S, β) στην 50S που φέρει την μετάλλαξη U2504A και γ) στην 50S με μετάλλαξη C2534T. Σκοπός αυτών των προσομοιώσεων ήταν να επιτρέψουμε στα συστήματα να προσαρμόσουν τη δομή τους στην παρουσία της λινεζολίδης και στο τέλος να υπολογισθούν οι αντίστοιχες ενέργειες αλληλεπίδρασης της λινεζολίδης με το περιβάλλον της. Η σύγκριση αυτών των ενεργειών θα επιτρέψει να αποφανθούμε για την ευστάθεια του συμπλόκου 50S-λινεζολίδης στις τρεις του μορφές. Η δομή της 50S από *E.coli* αποκτήθηκε από την ιστοσελίδα <http://rcsb.org/pdb/home/home.do> (Protein Data Bank) με κωδικό 2AW4.pdb [36].

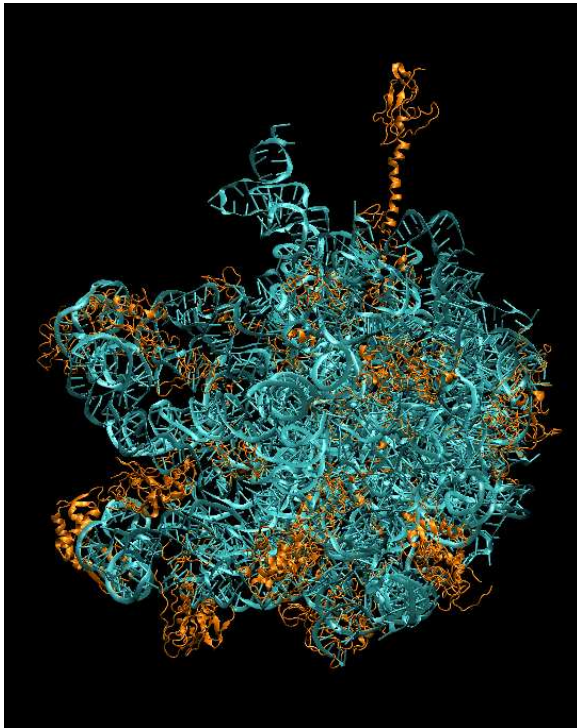
Ένα αρχείο pdb περιέχει τις συντεταγμένες στον χώρο, κάθε ατόμου ενός μορίου. Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα λειτουργικά σύστημα Linux Scientific Edition και Windows 7. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος NAMD [6]. Για την προετοιμασία των αρχείων για τις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα VMD [7]. Για την παραγωγή των διαγραμμάτων RMSD χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Excel. Επειδή η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια και για τα τρία στελέχη, θα περιγράψουμε

αντιπροσωπευτικά μόνο την διαδικασία για το στέλεχος του αγρίου τύπου και θα επισημάνουμε τις διαφορές στις υπόλοιπες.

2.1 50S αγρίου τύπου / Λινεζολίδη

2.1.1 Τεμαχισμός

Το αρχείο 2AW4.pdb που κατεβάσαμε από την Protein Data Bank είναι σε μορφή text. Προκειμένου να προχωρήσουμε στην δημιουργία του αρχείου psf και του pdb με τα υδρογόνα, το ‘κόψαμε’ σε 21 μικρότερα pdb όπου το καθένα αντιστοιχούσε σε μια αλυσίδα.



Εικόνα 8. 3D δομή της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας από E.coli αγρίου τύπου [36]. (Κυανό) rRNA, (πορτοκαλί) πρωτεΐνες.

2.1.2 Δημιουργία του αρχείου psf και pdb μαζί με τα υδρογόνα

Για να πραγματοποιηθεί μία προσομοίωση, είναι απαραίτητη η πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων των οποίων τις συντεταγμένες περιέχει ένα αρχείο pdb [18]. Γι αυτό το λόγο πρέπει να δημιουργήσουμε ένα αρχείο psf, το οποίο περιέχει αυτήν την πληροφορία καθώς και τις παραμέτρους του force field. Το αρχείο αυτό δημιουργείται από το πρόγραμμα psfgen με βάση

το αρχικό αρχείο `pdb` και ένα αρχείο τοπολογίας (topology file), το οποίο στην δική μας εργασία είναι το `top_all27_prot_na.inp` τροποποιημένο με την τοπολογία της λινεζολίδης. Έτσι λοιπόν, δημιουργήσαμε τα αρχεία `50S_wt.pdb` και `50S_wt.psf` με βάση τα οποία πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση. Το αρχείο `psf` και το νέο αρχείο `pdb`, το οποίο περιέχει και τις συντεταγμένες των ατόμων υδρογόνου, δημιουργήθηκε από την εφαρμογή `psfgen` με αντιγραφή του `tcl script` (σύνολο εκτελέσιμων εντολών) και επικόλληση στην κονσόλα του `psfgen`. Η δημιουργία του αρχείου `psf` και `pdb` μαζί με τα υδρογόνα έγινε με την βοήθεια ενός `tcl script` με το όνομα `psf_50S_wt.txt` και το οποίο παρατίθεται στο Παράρτημα.

2.1.3 Ενυδάτωση μορίου (Solvate)

Το επόμενο βήμα ήταν η διαλυτοποίηση σε μία σφαίρα νερού [18]. Επειδή όμως το σύστημα με τα μόρια νερού που προστέθηκαν μετατρέπονταν σε πολύ υπερβολικά «βαρύ» για την διαθέσιμη υπολογιστική ισχύ, ελαττώσαμε τα μόρια νερού σε ένα κέλυφος πάχους 3 Å γύρω από την 50S. Το περιβάλλον μέσα ή έξω από τα κύτταρα, όπου υπάρχουν και δρουν τα βιολογικά μακρομόρια (εκτός από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες), είναι υδατικό, συνεπώς η διαλυτοποίηση της 50S γίνεται σε νερό. Η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενός `tcl script` με το όνομα `solvate_50S_wt.txt` και το οποίο παρατίθεται στο Παράρτημα. Στην κονσόλα του VMD πληκτρολογούμε:

```
cd "τη διεύθυνση του φακέλου εργασίας μας"  
play solvate_50S_wt.txt
```

Το αποτέλεσμα είναι δύο νέα αρχεία, το `50S_wt_ws.pdb` και το `50S_wt_ws.psf`, τα οποία συμπεριλαμβάνουν την πληροφορία για το νερό ενυδάτωσης. Το πρόγραμμα δίνει επίσης τις συντεταγμένες του κέντρου μάζας του συστήματος, τις οποίες χρειαζόμαστε για την εκτέλεση της προσομοίωσης.

2.1.4 Προσθήκη ιόντων (Neutralization / Add Ions)

Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη ιόντων στο σύστημα, για να το καταστήσει ηλεκτρικά ουδέτερο. Γι αυτό τον λόγο προσθέτουμε ιόντα θετικά ή/και αρνητικά. Συνήθως προσθέτουμε Na για εξουδετέρωση αρνητικού φορτίου και Cl για την εξουδετέρωση θετικού φορτίου αντίστοιχα. Η προσθήκη αυτή δεν πραγματοποιήθηκε λόγω απουσίας της απαραίτητης ποσότητας μορίων νερού.

2.1.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας (Minimization)

Αυτό είναι το τελευταίο βήμα πριν από την εξισορρόπηση. Κατά την ελαχιστοποίηση, το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις, εδώ το NAMD, προσπαθεί να βρει ένα τοπικό ελάχιστο της ενέργειας του συστήματος προς μελέτη, από το οποίο μετά θα ξεκινήσει η εξισορρόπηση του συστήματος. Τα αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν από το πρόγραμμα namd2 είναι τα 50S_wt_ws.pdb και 50S_wt_ws.psf και το τροποποιημένο αρχείο παραμέτρων par_all27_prot_na.inp. Στο αρχείο min_50S_wt.txt ορίσαμε ότι τα αρχεία που θα προκύψουν από την ελαχιστοποίηση θα έχουν το πρόθεμα min_50S_wt, και ότι η ελαχιστοποίηση θα πραγματοποιηθεί για 4.000 βήματα. Η εντολή για την ελαχιστοποίηση που δόθηκε μέσα από τη γραμμή εντολών του λειτουργικού συστήματος Linux ήταν η εξής:

```
./charmrun ++local namd2 +p2 min_50S_wt.txt > log_min_50S_wt.txt
```

Στο τέλος της ελαχιστοποίησης προέκυψαν τέσσερα νέα αρχεία, τα min_50S_wt_ws.coor, min_50S_wt_ws.vel, min_50S_wt_ws.xls και log_min_50S_wt.txt. Το τελευταίο αρχείο είναι ένα αρχείο κειμένου στο οποίο το πρόγραμμα namd2 αποθηκεύει ανά τακτά χρονικά διαστήματα πληροφορίες για την πορεία της ελαχιστοποίησης. Το αρχείο min_50S_wt_ws.coor περιέχει τις συντεταγμένες όλων των ατόμων του συστήματος με ελαχιστοποιημένη ενέργεια και χρησιμοποιείται σαν αφετηρία για το στάδιο της εξισορρόπησης. Το script της ελαχιστοποίησης min_50S_wt.txt παρατίθεται στο Παράρτημα.

2.1.6 Εξισορρόπηση (Equilibration)

Οι προσομοιώσεις που εκτελούνται από το πρόγραμμα NAMD, έχουν την ίδια φιλοσοφία με εκείνες της ελαχιστοποίησης. Ο σκοπός αυτής της φάσης είναι να σταθεροποιηθούν αναφορικά με το χρόνο, διάφορες ιδιότητες του συστήματος (ανάλογα με το στατιστικό σύνολο που επιλέγουμε) όπως η ενέργεια, η θερμοκρασία, και η πίεση. Ομοίως με την ελαχιστοποίηση, χρειάζεται ένα script στο οποίο ορίζονται οι συνθήκες της προσομοίωσης, τα αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν, και κάποιοι παράμετροι. Στο script της εξισορρόπησης ορίσαμε ότι τα αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν από το πρόγραμμα namd2 είναι τα `min_50S_wt_ws.coor` και `50S_wt_ws.psf`. Το αρχείο παραμέτρων θα είναι πάλι το τροποποιημένο `par_all27_prot_na.inp`. Ορίσαμε επίσης, ότι όλα τα αρχεία που θα προκύψουν από την εξισορρόπηση θα έχουν το πρόθεμα `eq_50S_wt_ws`. Πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές προσομοιώσεις σε θερμοκρασία 300 K συνολικής χρονικής διάρκειας 700 ps. Η διάρκεια αυτή δεν εξασφαλίζει την πλήρη εξισορρόπηση του συστήματος, αλλά αποτελεί έναν αναγκαστικό συμβιβασμό λόγω της περιορισμένης διαθέσιμης υπολογιστικής ισχύος και του μεγάλου μεγέθους του υπό μελέτη συστήματος. Τόσο κατά τη διάρκεια της ελαχιστοποίησης, όσο και της εξισορρόπησης διατηρήσαμε τις θέσεις ατόμων φωσφόρου των νουκλεοτιδίων 878, 898, 2094 και 2195 της αλυσίδας του 23S rRNA σταθερές (fixed atoms). Τα άτομα αυτά ανήκουν στα άκρα διακοπών της αλυσίδας και η ρύθμιση αυτή αποσκοπεί στην αποφυγή της αποσταθεροποίησης αυτών των περιοχών. Η πληροφορία για τα fixed atoms δηλώνεται στο αρχείο `pdb` με κατάληξη `ref`, αλλάζοντας τον αριθμό 0 της προτελευταίας στήλης των εν λόγω ατόμων σε 1. Η εντολή για την εξισορρόπηση που δόθηκε μέσα από τη γραμμή εντολών του λειτουργικού συστήματος Linux ήταν η εξής:

```
./charmrun ++local namd2 +p2 eq_50S_wt_ws.txt >  
log_eq_50S_wt_ws.txt.
```

Το αρχείο `log_eq_50S_wt_ws.txt` μας παρουσιάζει την εξέλιξη της εξισορρόπησης ανά τακτά διαστήματα βημάτων. Στο παράρτημα παρατίθεται ένα απόσπασμα ενός τέτοιου αρχείου. Αξίζει να σημειωθεί, πως πριν την έναρξη κάθε εξισορρόπησης πραγματοποιούνταν ελαχιστοποίηση 100 βημάτων με αυτόματο τρόπο. Στο τέλος της εξισορρόπησης προέκυψαν 10 νέα αρχεία, τα `eq_50S_wt_ws.dcd`, `eq_50S_wt_ws.coor`, `eq_50S_wt_ws.vel`, `eq_50S_wt_ws.xsc`, `eq_50S_wt_ws.restart.xsc.old`, `eq_50S_wt_ws.restart.xsc`, `eq_50S_wt_ws.restart.vel.old`, `eq_50S_wt_ws.restart.vel`, `eq_50S_wt_ws.restart.coor.old` και `eq_50S_wt_ws.restart.coor`.

Το script της εξισορρόπησης `eq_50S_wt_ws.txt` παρατίθεται στο Παράρτημα.

2.1.7 Τελική ελαχιστοποίηση (Final Minimization)

Πριν από τους ενεργειακούς υπολογισμούς πραγματοποιήσαμε μία τελευταία ελαχιστοποίηση των εξισορροπημένων δομών 500 βημάτων. Όπως και στην πρώτη ελαχιστοποίηση, και εδώ χρησιμοποιήσαμε ένα script, στο οποίο ορίσαμε ότι θα χρησιμοποιηθεί το αρχείο `eq_50S_wt_ws.coor` που προέκυψε από την εξισορρόπηση. Κατά τα άλλα, οι υπόλοιπες παράμετροι παρέμειναν ίδιες.

2.1.8 Υπολογισμός του RMSD

Μπορούμε σε ένα διάγραμμα δημιουργώντας το στο Excel, να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της εξισορρόπησης. Αυτά τα στιγμιότυπα περιέχονται στο αρχείο τύπου `dcd`, και η συχνότητά τους ορίζεται στο script της εξισορρόπησης. Στο δικό μας script ορίστηκε ότι θα καταγράφονται στιγμιότυπα για κάθε 500 (1ps) βήματα της εξισορρόπησης. Άρα συνολικά έχουμε 700 στιγμιότυπα. Για να θεωρήσουμε ότι η εξισορρόπηση έχει φτάσει σε ένα ικανοποιητικό σημείο, η μεταβολή του RMSD θα πρέπει να έχει φτάσει σε ένα πλατό, να σταθεροποιείται δηλαδή γύρω από μία τιμή. Στην παρούσα εργασία δεν ελετεύχθη αυτό, λόγω του χρονικού περιορισμού. Με την βοήθεια τώρα ενός άλλου script, συγκεκριμένα του

rmsd_dcd.txt, που παρατίθεται στο Παράρτημα, δημιουργήσαμε ένα αρχείο κειμένου, το οποίο περιέχει σε μία λίστα όλες τις τιμές του RMSD που αντιστοιχούν σε κάθε στιγμιότυπο. Αρχικά φορτώσαμε στο VMD το αρχείο min_50S_wt_ws.coor και μετά ακολουθήσαμε τα βήματα: VMD main > File > New molecule στο παράθυρο Molecular File Browser. Στο VMD main επιλέγουμε Load Data Into Molecule και φορτώσαμε το αρχείο eq_50S_wt_ws.dcd. Στην κονσόλα του VMD, Tk Console, πληκτρολογήσαμε:

```
cd «τη διεύθυνση του φακέλου εργασίας μας»  
play rmsd_dcd.txt
```

Τα διαγράμματα με τις μεταβολές του RMSD και για τα τρία συστήματα της μελέτης μας, παρουσιάζονται παρακάτω στην ενότητα Αποτελέσματα.

2.2 50S με U2504A / Λινεζολίδη

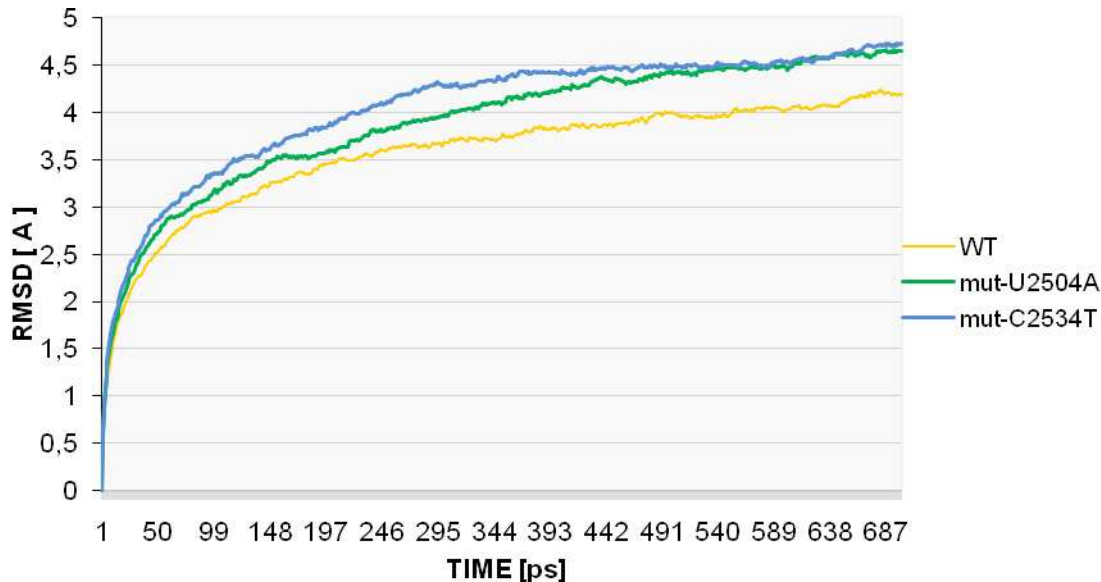
Έχει γίνει σημειακή μεταλλαγή στην νουκλεοτιδική βάση υπ' αριθμόν 2504 και αντί για ουρακίλη (U) υπάρχει αδερίνη (A). Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία και το σύνολο βημάτων της προσομοίωσης, με εκείνα για το στέλεχος του αγρίου τύπου. Η μοναδική διαφορά ήταν η τροποποίηση του ονόματος των αρχείων. Το όνομα ήταν το εξής: 50S_mut-U2504A_ZLD_ws.είδος αρχείου .

2.3 50S με C2534T / Λινεζολίδη

Έχει γίνει σημειακή μετάλλαξη στην νουκλεοτιδική βάση υπ' αριθμόν 2534 και αντί για κυτοσίνη (C) υπάρχει θυμίνη (T). Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία και το σύνολο βημάτων της προσομοίωσης, με εκείνα για το στέλεχος του αγρίου τύπου. Η μοναδική διαφορά ήταν η τροποποίηση του ονόματος των αρχείων διότι είχαμε μεταλλαγμένο στέλεχος. Το όνομα ήταν το εξής: 50S_mut-C2534T_ZLD_ws.είδος αρχείου .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ



Εικόνα 9: Διάγραμμα της μεταβολής του RMSD για στέλεχος αγρίου τύπου, στέλεχος U2504A και στέλεχος C2534U κατά την πάροδο του χρόνου.

Στο διάγραμμα της Εικόνας 9, φαίνεται η πλήρης πορεία της μεταβολής της δομής και για τα τρία στελέχη, wt, U2504A, C2534T, για 700 στιγμιότυπα. Υπενθυμίζεται, ότι κάθε στιγμιότυπο ισοδυναμεί με 500 βήματα στην εξισορρόπηση (1ps). Στον οριζόντιο άξονα των διαγραμμάτων, είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων, ενώ στον κάθετο άξονα είναι ο δείκτης RMSD. Παρατηρούμε, ότι δεν έχουν εξισορροπηθεί για το σύνολο των 350.000 βημάτων. Μια πρώτη απότομη αύξηση του RMSD παρατηρείται κατά την έναρξη της εξισορρόπησης για τα πρώτα 2500 - 3000 βήματα. Από τη συγκεκριμένη μεταβολή μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι και τα τρία στελέχη υφίστανται σημαντικές μεταβολές οι οποίες θα αυξάνονταν με μικρότερο ρυθμό εάν συνεχίζαμε τις προσομοιώσεις.

Πίνακας 1. Ενέργειες αλληλεπίδρασης λινεζολίδης/50S.

Ενέργειες [kcal/mol]		
WT		
Elec	VdW	Nonbond
-53.9	-47.1	-101.0
U2504A		
Elec	VdW	Nonbond
-58.7	-47.6	-106.3
C2534U		
Elec	VdW	Nonbond
-73.1	-25.6	-98.7

Elec: Αλληλεπίδραση των φορτίων της λινεζολίδης με όλα τα υπόλοιπα φορτία του συστήματος.

VdW: Αλληλεπίδραση των ατόμων λινεζολίδης με όλα τα υπόλοιπα άτομα της συστήματος.

Nonbond: Άθροισμα Elec + VdW

Πίνακας 2. Δυναμικές ενέργειες του ολικού συστήματος.

Σύστημα	Δυναμική ενέργεια [kcal/mol]
WT	-464.644,4
U2504A	-466.025,8
C2534U	-466.131,0

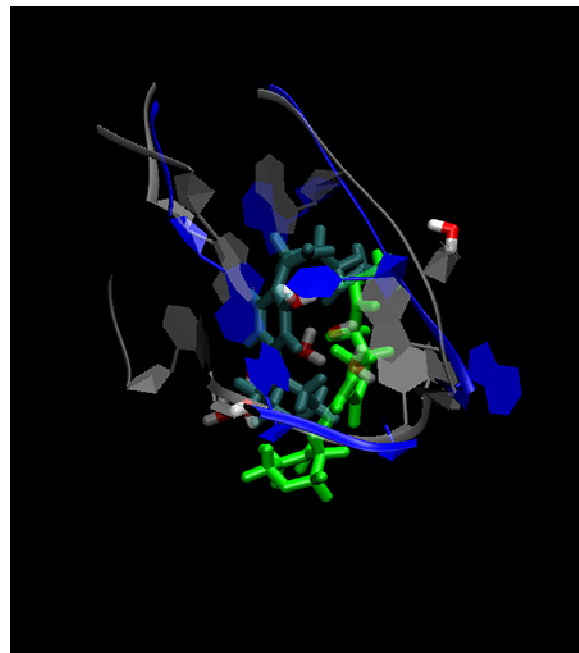
Σημαντικές διαφορές διαπιστώνονται τόσο στην δομή της λινεζολίδης όσο της άμεσης γειτονιάς της πριν και μετά τις μεταλλάξεις (Εικόνες 9, 10). Η λινεζολίδα και στις δύο μεταλλάξεις εμφανίζεται σε μια πιο ανοικτή μορφή και μετατοπισμένη ως προς την θέση της στην wild type. Η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης (Πίνακας 1) της λινεζολίδης με το υπόλοιπο σύστημα 50S της wild type είναι 101.0 kcal/mol, ενώ αυτή για τις μεταλλάξεις U2504A και C2534T είναι -106.3 και -98.7 kcal/mol αντίστοιχα, με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις να είναι πιο αποφασιστικές. Σύμφωνα με αυτά τα

αποτελέσματα η λινεζολίδη εμφανίζεται να συνδέεται σταθερότερα με την μεταλλαγμένη (U2504A) υπομονάδα από ό,τι με την wild type. Αυτό δεν συμφωνεί με τις ανθεκτικότητες που έχουν παρατηρηθεί. Αντίθετα, η μετάλλαξη C2534T φαίνεται να αποσταθεροποιεί το σύμπλοκο 50S-λινεζολίδη προσδίδοντας ανθεκτικότητα. Η μερική ασυμφωνία των αποτελεσμάτων αυτών με τις εργαστηριακές παρατηρήσεις μπορεί να οφείλεται στους εξής παράγοντες:



Εικόνα 9. Περιοχή της άμεσης γειτονιάς της λινεζολίδης

WT: rRNA (γκρι) – λινεζολίδη (κυανό) U2504A: rRNA (κίτρινο) – λινεζολίδη (πορτοκαλί)



Εικόνα 10. Περιοχή της άμεσης γειτονιάς της λινεζολίδης

WT: rRNA (λευκό) – λινεζολίδη (κυανό) C2534T: rRNA (μπλε) – λινεζολίδη (πράσινο)

1. Ανεπαρκής χρόνος προσομοίωσης
Ολοκλήρωση της προσομοίωσης μπορεί να έδινε διαφορετικές τιμές.
2. Μη ορθή παραμετροποίηση της λινεζολίδης
Οι παράμετροι που χρησιμοποιήσαμε δεν έχουν τελειοποιηθεί ακόμη.
3. Η προσομοίωση έγινε σε *E.coli* και όχι σε *S. epidermidis*.

4. Ανθεκτικότητα οφειλόμενη σε άλλους παράγοντες εκτός της ασταθούς πρόσδεσης της λινεζολίδης στον συγκεκριμένο θύλακα.

Ενδέχεται η παρουσία αντιγράφων να επηρεάζει την ανθεκτικότητα περισσότερο από την ευστάθεια του συμπλόκου. Οι μετρήσεις αντικατοπτρίζουν το ένα μόνο αντίγραφο που φέρει την υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα μετάλλαξη σε κάθε στέλεχος και όχι το σύνολο των αντιγράφων [15].

Εφόσον η ίδια η U2504A αλληλεπιδρά με τον δακτύλιο A της λινεζολίδης επηρεάζει άμεσα την πρόσδεσή της στη επικράτεια V του 23S rRNA. Φαίνεται όμως, ότι η επαγόμενη από τη μετάλλαξη μεταβολή της θέσης της λινεζολίδης καθώς και η σημαντική αναδιάταξη των ομάδων του θύλακα πρόσδεσης αντισταθμίζουν την διαταραχή με αποτέλεσμα την μείωση (αρνητικότερη) της ενέργειας αλληλεπίδρασης. Όσο αναφορά στη μετάλλαξη C2534T, έχει ενοχοποιηθεί για την ανθεκτικότητα έναντι στη λινεζολίδα σε στελέχη *S. epidermidis*. Παρέχει την ανθεκτικότητα είτε μόνη της είτε συνεργιστικά με άλλες μεταλλάξεις της επικράτειας V του 23S rRNA. Αυτή η σημειακή μετάλλαξη είναι δυνατόν να επιφέρει αλλαγή στη διαμόρφωση του θύλακα, αναστέλλοντας την πρόσδεση της λινεζολίδης και την εκδήλωση ανθεκτικότητας. Ενδεχομένως, η υψηλή συχνότητα παρουσίας της οφείλεται στο γεγονός, ότι η συγκεκριμένη Κυτοσίνη (C) δεν είναι τμήμα του θύλακα των εξαιρετικά συντηρημένων νουκλεοτιδίων και πιθανώς δε διαθέτει κάποιο σημαντικό λειτουργικό ρόλο κατά τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης [25]. Οι ολικές δυναμικές ενέργειες είναι παρεμφερείς και στα τρία συστήματα, υποδηλώνοντας, είτε ότι οι διαταραχές επί του συνολικού συστήματος είναι μικρές, είτε ότι επέρχεται μερική αντιστάθμιση των δυσμενών για την πρόσδεση τοπικών αλλαγών με αναδιατάξεις σε άλλα σημεία του συμπλόκου.

Σύμφωνα όμως με δεδομένα της CLSI, το στέλεχος αγρίου τύπου χρειάζεται περίπου 4 µg/ml, ενώ το μεταλλαγμένο 256 µg/ml! Η διαφορά είναι μεγάλη. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνονται και με τις ποσότητες λινεζολίδης, για το αγρίου τύπου 5 µg/ml και για το μεταλλαγμένο στέλεχος C2534T 12 µg/ml.

Στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας έγινε μια πρώτη προσπάθεια κατανόησης σε ατομικό επίπεδο της ανθεκτικότητας του *S.epidermidis* με συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο 23S rRNA. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 2.1.6, λόγω του εξαιρετικά μεγάλου μεγέθους ατόμων του συστήματος 50S / λινεζολίδη που μελετήσαμε, δεν πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση σε ικανοποιητικό βαθμό παρά τον σχετικά μεγάλο χρόνο των προσομοιώσεων για τον συγκεκριμένο αριθμό ατόμων. Η σύγκριση έγινε στις δομές που προέκυψαν μετά από τον ίδιο χρόνο προσομοιώσεων και είναι ό,τι καλύτερο μπορούσε να γίνει με τις δεδομένες δυνατότητες. Οι εξισορροπήσεις όμως των διαφόρων μεταλλάξεων μπορεί να απαιτούν διαφορετικούς χρόνους προσομοίωσης και η αναγκαστική προσέγγισή μας να έδωσε εσφαλμένα αποτελέσματα. Μια μελλοντική σχολαστική μελέτη των ίδιων συστημάτων ελπίζουμε ότι θα δώσει καλύτερα αποτελέσματα.

- [1] BROCK, Madigan, Martinko, Parker. Βιολογία των μικροοργανισμών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2007
- [2] Draghi DC, Sheehan DJ, Hogan P, Sahm DF. In vitro activity of linezolid against key gram-positive organisms isolated in the united states: results of the LEADER 2004 surveillance program. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Dec;49(12):5024-32.
- [3] D.J. and Jones .Oxazolidinones: A Review. Drugs , Diekema, R.N. 2000
- [4] D.J. and Jones .Oxazolidinone antibiotics. The Lancet , Diekema, D.J. and Jones, R.N. 2001
- [5] Hedin G (1993), "Staphylococcus epidermidis – hospital epidemiology and the detection of methicillin resistance", Scandinavian Journal of Infectious Diseases
- [6] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, Phillips et al., J. Comp. Chem. 26:1781-1802 (2005)
- [7] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>, Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics, 1996, vol. 14, pp. 33-38
- [8] <http://staff.science.nus.edu.sg/~phywjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>
- [9] Jaroslaw Meller .“Molecular Dynamics”, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001, Nature Publishing Group / www.els.net
- [10] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer .Βιοχημεία I & II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2005
- [11] John MA, Pletch C, Hussain Z. In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telithromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2002 Dec;50(6):933-8.
- [12] John McMurry .Οργανική Χημεία , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2004
- [13] Lewin B. .Genes VIII , Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.,2004

- [14] Liakopoulos Apostolos, Charalambos Neocleous, Dimitra Klapsa, Maria Kanellopoulou, Iris Spiliopoulou, Kostas D. Mathiopoulos, Evangelos Papafrangas and Efi Petinaki, 2009. A T2504A mutation in the 23S rRNA gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*.
- [15] Meka, V.G. and Gold, H.S. (2004). Antimicrobial resistance to Linezolid. *Antimicrobial Resistance* 39, 1010-1015.
- [16] Michael P. Allen. "Introduction to Molecular Dynamics Simulation", *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Lecture Notes, Norbert Attig, Kurt Binder, Helmut Grubmüller, Kurt Kremer (Eds.), John von Neumann Institute for Computing, Juelich, NIC Series, Vol. 23, ISBN 3-00-012641-4, pp. 1-28, 2004.
- [17] M. J. Field, *A practical introduction to the simulation of molecular systems*. Cambridge University Press, 1999.
- [18] NAMD tutorial, University of Illinois at Urbana-Champaign, NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics, Beckman Institute, Computational Biophysics Workshop, October 2007
- [19] Otto M (2009), "Staphylococcus epidermidis – the 'accidental' pathogen", *Nature Reviews Microbiology* 7 (8): 555-567, doi:10.1038/nrmicro2182
- [20] Page, C. et al. (2000). *Φαρμακολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- [21] *Principles of protein-protein interactions*, Sarah A. Teichmann, *BIOINFORMATICS*, Vol. 18 Suppl. 2 2002
- [22] Schmeing, T., Huang, K., Strobel, S. and Steitz, T.. *NATURE*. An induced fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA.
- [23] University of Illinois and Beckman Institute. *VMD User's Guide*, Version 1.8.6, April 3, 2007, Theoretical and Computational Biophysics Group1.
- [24] University of Illinois and Beckman Institute. *NAMD User's Guide*, M. Bhandarkar, R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, J. Henin, W. Humphrey, D. Hurwitz, N. Krawetz, S. Kumar, M. Nelson, J. Phillips, A. Shinozaki, G. Zheng, F. Zhu, 2006, Theoretical Biophysics Group,

D. Frenkel and B. Smit Understanding molecular simulations. Academic Press, 2002.

[25]Youngman, E.M, Brunelle, J.L, Kochaniak, A.B. nad Green, R.. CELL. The site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. 117, 589-599

[26]Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A., Connell, S.R. and Fucini, P.. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning. 2008

a. Το script για την δημιουργία psf αρχειων

```
#package require psfgen
topology top_all27_prot_na.inp
```

```
alias residue A ADE
alias residue G GUA
alias residue C CYT
alias residue U URA
alias residue HIS HSE
alias residue MG MG
alias residue CL CLA
alias residue HOH TIP3
```

```
set reslist "CYT GUA ADE THY URA"
foreach resid $reslist {
  alias atom $resid O5* O5'
  alias atom $resid C5* C5'
  alias atom $resid C4* C4'
  alias atom $resid O4* O4'
  alias atom $resid C3* C3'
  alias atom $resid O3* O3'
  alias atom $resid C2* C2'
  alias atom $resid C1* C1'}
```

```
alias atom ILE CD1 CD
alias atom ALA 1HB HB1
alias atom ALA 2HB HB2
alias atom ALA 3HB HB3
alias atom ALA 1H HT1
alias atom ALA 2H HT2
alias atom ALA 3H HT3
alias atom ALA O OT1
alias atom ALA OXT OT2
```

```
alias atom LYS OXT OT2
alias atom GLU OXT OT2
alias atom MET OXT OT2
alias atom PHE OXT OT2
alias atom ASN OXT OT2
alias atom ARG OXT OT2
alias atom ASP OXT OT2
alias atom ALA H HN
alias atom CL CL CLA
alias atom TIP3 O OH2
```

```
segment A {
  pdb 50S_A.pdb
  first none
  last none
}
coordpdb 50S_A.pdb A
guesscoord
```

Ομοίως για B1, B2_no_2096-2110, B4_no_2179-2188, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, ,P, Q, R,S, T, U, V, W, X, Y, Z, O, 1, 2, 3, 4, MG, HOH

```
writedb 50S_wt_no_B2096-2188_H.pdb
writepsf 50S_wt_no_B2096-2188_H.psf
resetpsf
```

b. Το script για την διαλυτοποίηση

Water Sphere tcl Script

```
# finds a center of mass of the molecule (Yo.pdb), place a sphere of water
# around it.
```

```
# To run execute: vmd -dispdev text -e solvate_Yo.txt
```

```
proc center_of_mass {selection} {
```

```
    # some error checking
    if {[{selection num} <= 0] } {
        error "center_of_mass: needs a selection with atoms"
    }
    # set the center of mass to 0
    set com [veczero]
    # set the total mass to 0
    set mass 0
    # [$selection get {x y z}] returns the coordinates {x y z}
    # [$selection get {mass}] returns the masses
    # so the following says "for each pair of {coordinates} and masses,
    # do the computation ..."
    foreach coord [$selection get {x y z}] m [$selection get mass] {
        # sum of the masses
        set mass [expr $mass + $m]
        # sum up the product of mass and coordinate
        set com [vecadd $com [vecscale $m $coord]]
    }
    # and scale by the inverse of the number of atoms
    if {$mass == 0} {
        error "center_of_mass: total mass is zero"
    }
    # The "1.0" can't be "1", since otherwise integer division is done
    return [vecscale [expr 1.0/$mass] $com]
}
```

```
#####
#           MAIN PART STARTS HERE
#####
```

```
set psf    50S_wt_no_B2096-2188_H.psf
set pdb    50S_wt_no_B2096-2188_H.pdb
set box    50S_wt_box
set psfDrop 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws.psf
set pdbDrop 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws.pdb
```

```
package require psfgen
#f
resetpsf
```

```
mol load psf $psf pdb $pdb
set sel [atomselect top all]
# find mass center
set center [center_of_mass $sel]
puts "center of mas is at $center"
```

```
## ATTENTION MODIFICATION ! Here I set the coordinates of the sphere by hand
#set center {103.630 -40.213 -91.334}
# =====
```

```
foreach {xmass ymass zmass} $center { break }
```

```
set numo 9999
set Rmin 0.0
```

```
while {$numo != 0} {
    set Rmin [expr $Rmin + 1.0]
```

```

    set probSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass) <= sqr($Rmin))"]
    set numo [$probSel num]
    puts "$numo $Rmin"
}

package require solvate
set all 3.0
set Rmin [expr $Rmin + $all]
set xmin [expr $xmass -$Rmin]
set xmax [expr $xmass +$Rmin]

set ymin [expr $ymass -$Rmin]
set ymax [expr $ymass +$Rmin]

set zmin [expr $zmass -$Rmin]
set zmax [expr $zmass +$Rmin]

puts " $xmin $ymin $zmin $xmax $ymax $zmax"
#solvate $psf $pdb -o $box -minmax {{15.4399995804 12.8879995346
-0.365999996662} {46.125 45.2680015564 36.2509994507} }

set min "$xmin $ymin $zmin"
set max "$xmax $ymax $zmax"
set minmax [list $min $max]

set pad 3.0
solvate $psf $pdb -o $box -minmax $minmax

mol delete top

resetpsf

mol load psf ${box}.psf pdb ${box}.pdb

readpsf ${box}.psf
coordpdb ${box}.pdb

set selDel [atomselect top "not (protein or nucleic or resname MG or resname ZLD or segname 6) and not (same residue
as water and within 3 of protein or nucleic or resname MG or resname ZLD or segname 6)"]

puts " not within [$selDel num]"

#set testSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) + sqr(z-$zmass) <= sqr($Rmin)) and (not water)"]
#puts " not within and not water [$testSel num]"

#if { [$testSel num] != 0 } {
# puts "ERROR: there are [$testSel num] non water molecules outside the shell"
# puts "EXIT"
# exit
#}

set delList [$selDel get {segid resid}]

set delList [lsort -unique $delList]

foreach record $delList {
    foreach {segid resid} $record { break }
    delatom $segid $resid
}

writepsf $psfDrop
writepdb $pdbDrop

```

```
# remove temporary files generated by the script
file delete ${box}.psf ${box}.pdb combine.pdb combine.psf
```

```
puts "CENTER OF MASS IS AT: $center"
puts "SPHERE RADIUS:    $Rmin"
```

```
#exit
```

c. *To script για την ελαχιστοποίηση*

```
# NAMD CONFIGURATION FILE FOR neutr_head_ws.pdb in water sphere
```

```
# protocol params
```

```
# initial config
```

```
coordinates      50S_wt_no_B2096-2188_H_ws.pdb
temperature      300K
seed             12345
outputEnergies   1
```

```
# output params
```

```
outputname       min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws.
binaryoutput     no
```

```
# integrator params
```

```
timestep 1.0
```

```
# force field params
```

```
structure 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws.psf
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na_LNZ_trop_2.inp
exclude    scaled1-4
1-4scaling 1.0
switching on
switchdist 8.0
cutoff      12.0
pairlistdist 13.5
margin      0.0
stepspercycle 20
```

```
# Constraints and restraints
```

```
fixedAtoms on
fixedAtomsForces on
fixedAtomsFile 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws.ref
fixedAtomsCol B
```

```
minimize 4000
```

d. *To script για την εξισορρόπηση*

```
#####
### JOB DESCRIPTION
#####
```

```
## ADJUSTABLE PARAMETERS
```

```
#####
```

```
binaryrestart no
```

```
structure 50S_mut-G2576U_ZLD_ws.psf
bincordinates eq_50S_mut-G2576U_ZLD_ws_o.restart.coor
Coordinates min_50S_mut-G2576U_ZLD_ws.coor
set temperature 300
set outputname eq_50S_mut-G2576U_ZLD_ws_1
```

```

firsttimestep 0

#####
## SIMULATION PARAMETERS
#####

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all27_prot_na_LNZ_trop_2.inp
temperature $temperature

# Force-Field Parameters
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
cutoff 12.
switching on
switchdist 10.
pairlistdist 13.5

# Integrator Parameters
timestep 2.0 # 2fs/step
rigidBonds all # needed for 2fs steps
nonbondedFreq 1
fullElectFrequency 2
stepspercycle 10

# Constant Temperature Control
langevin on # do langevin dynamics
langevinDamping 5 # damping coefficient (gamma) of 5/ps
langevinTemp $temperature
langevinHydrogen off # don't couple langevin bath to hydrogens

# Output
outputName $outputname
restartfreq 500 # 500steps = every 1ps
dedfreq 500
outputEnergies 100
outputPressure 100

#####
## EXTRA PARAMETERS
#####

# Spherical boundary conditions
sphericalBC on
sphericalBCcenter 84.13195 -43.260 -101.57342
sphericalBCr1 131.0 # distance at which the first boundary potential begins to act
sphericalBCk1 10 # force constant for the harmonic bountary potential
sphericalBCexp1 2

# Constraints and restraints
fixedAtoms on
fixedAtomsForces on
fixedAtomsFile 50S_mut-G2576U_ZLD_ws.ref
fixedAtomsCol B

#####
## EXECUTION SCRIPT
#####

# Minimization
#minimize 100
reinitvels $temperature;

run 50000; # 100 ps

```


e. To script για τον υπολογισμό της μεταβολής του RMSD

Load from VMD Main .coor and load in molecule .dcd. (like A_HOH_ws_min.coor and A_HOH_ws_eq.dcd)

Run from the command line this script.

```
set outfile [open rmsd.txt w];
set nf [molinfo top get numframes]
set frame0 [atomselect top "protein and backbone and noh" frame 0]
# rmsd calculation loop
for {set i 1} {$i < $nf} {incr i} {
  set sel [atomselect top "protein and backbone and noh" frame $i]
  $sel move [measure fit $sel $frame0]
  puts $outfile "[measure rmsd $sel $frame0]"
}
close $outfile
```

d. Απόσπασμα από το αρχείο log της εξισορρόπησης 50000 step

e. Warning> Randomization of stack pointer is turned on in kernel, thread migration may not work! Run 'echo 0 > /proc/sys/kernel/randomize_va_space' as root to disable it, or try run with '+isomalloc_sync'.

f. Charm++: scheduler running in netpoll mode.

g. Charm++> Running on 1 unique compute nodes (4-way SMP).

h. Charm++> Cpu topology info:

i. PE to node map: 0 0 0 0

j. Node to PE map:

k. Chip #0: 0 1 2 3

l. Charm++> cpu topology info is gathered in 0.001 seconds.

m. Info: NAMD 2.7b3 for Linux-x86_64

n. Info:

o. Info: Please visit <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

p. Info: and send feedback or bug reports to namd@ks.uiuc.edu

q. Info:

r. Info: Please cite Phillips et al., J. Comp. Chem. 26:1781-1802 (2005)

s. Info: in all publications reporting results obtained with NAMD.

t. Info:

u. Info: Based on Charm++/Converse 60200 for net-linux-x86_64-iccstatic

v. Info: Built Mon Jul 5 18:56:29 CDT 2010 by jim on belfast.ks.uiuc.edu

w. Info: 1 NAMD 2.7b3 Linux-x86_64 4 localhost.localdomain nikelion

x. Info: Running on 4 processors.

y. Info: CPU topology information available.

z. Info: Charm++/Converse parallel runtime startup completed at 0.00371909 s

aa. Info: 1.63368 MB of memory in use based on CmiMemoryUsage

bb. Info: Configuration file is eq_5oS_mut-C2534U_ZLD_ws_o.txt

cc. TCL: Suspending until startup complete.

dd. Info: SIMULATION PARAMETERS:

ee. Info: TIMESTEP 2

ff. Info: NUMBER OF STEPS 0

gg. Info: STEPS PER CYCLE 10

hh. Info: LOAD BALANCER Centralized

ii. Info: LOAD BALANCING STRATEGY New Load Balancers -- ASB

jj. Info: LDB PERIOD 2000 steps

kk. Info: FIRST LDB TIMESTEP 50

ll. Info: LAST LDB TIMESTEP -1

mm. Info: LDB BACKGROUND SCALING 1

nn. Info: HOM BACKGROUND SCALING 1

oo. Info: MAX SELF PARTITIONS 20

pp. Info: MAX PAIR PARTITIONS 8

qq. Info: SELF PARTITION ATOMS 154

rr. Info: SELF2 PARTITION ATOMS 154

ss. Info: PAIR PARTITION ATOMS 318

tt. Info: PAIR2 PARTITION ATOMS 637

uu. Info: MIN ATOMS PER PATCH 100

vv. Info: INITIAL TEMPERATURE 300

ww. Info: CENTER OF MASS MOVING INITIALLY? NO

xx. Info: DIELECTRIC 1

yy. Info: EXCLUDE SCALED ONE-FOUR

zz. Info: 1-4 SCALE FACTOR 1

aaa. Info: DCD FILENAME eq_5oS_mut-C2534U_ZLD_ws_o.dcd

bbb. Info: DCD FREQUENCY 500

ccc. Info: DCD FIRST STEP 500

ddd. Info: NO EXTENDED SYSTEM TRAJECTORY OUTPUT

eee. Info: NO VELOCITY DCD OUTPUT

fff. Info: OUTPUT FILENAME eq_5oS_mut-C2534U_ZLD_ws_o

ggg. Info: BINARY OUTPUT FILES WILL BE USED

hhh. Info: RESTART FILENAME eq_5oS_mut-C2534U_ZLD_ws_o.restart
iii. Info: RESTART FREQUENCY 500
jjj. Info: SWITCHING ACTIVE
kkk. Info: SWITCHING ON 10
lll. Info: SWITCHING OFF 12
mmm. Info: PAIRLIST DISTANCE 13.5
nnn. Info: PAIRLIST SHRINK RATE 0.01
ooo. Info: PAIRLIST GROW RATE 0.01
ppp. Info: PAIRLIST TRIGGER 0.3
qqq. Info: PAIRLISTS PER CYCLE 2
rrr. Info: PAIRLISTS ENABLED
sss. Info: MARGIN 0
ttt. Info: HYDROGEN GROUP CUTOFF 2.5
uuu. Info: PATCH DIMENSION 16
vvv. Info: ENERGY OUTPUT STEPS 100
www. Info: CROSSTERM ENERGY INCLUDED IN DIHEDRAL
xxx. Info: TIMING OUTPUT STEPS 1000
yyy. Info: PRESSURE OUTPUT STEPS 100
zzz. Info: FIXED ATOMS ACTIVE
aaaa. Info: FORCES BETWEEN FIXED ATOMS ARE CALCULATED
bbbb. Info: SPHERICAL BOUNDARY CONDITIONS ACTIVE
cccc. Info: RADIUS #1 131
dddd. Info: FORCE CONSTANT #1 10
eeee. Info: EXPONENT #1 2
fff. Info: SPHERE BOUNDARY CENTER(84.1314, -43.2598, -101.574)
ggg. Info: LANGEVIN DYNAMICS ACTIVE
hhh. Info: LANGEVIN TEMPERATURE 300
iii. Info: LANGEVIN DAMPING COEFFICIENT IS 5 INVERSE PS
jjj. Info: LANGEVIN DYNAMICS NOT APPLIED TO HYDROGENS
kkk. Info: USING VERLET I (r-RESPA) MTS SCHEME.
lll. Info: C1 SPLITTING OF LONG RANGE ELECTROSTATICS
mmm. Info: PLACING ATOMS IN PATCHES BY HYDROGEN GROUPS
nnn. Info: RIGID BONDS TO HYDROGEN : ALL
ooo. Info: ERROR TOLERANCE : 1e-08
ppp. Info: MAX ITERATIONS : 100
qqq. Info: RIGID WATER USING SETTLE ALGORITHM
rrr. Info: RANDOM NUMBER SEED 1285156452
sss. Info: USE HYDROGEN BONDS? NO
ttt. Info: COORDINATE PDB min_5oS_mut-C2534U_ZLD_ws.coor
uuu. Info: STRUCTURE FILE 5oS_mut-C2534U_ZLD_ws.psf
vvv. Info: PARAMETER file: CHARMM format!
www. Info: PARAMETERS par_all27_prot_na_LNZ_trop_2.inp
xxx. Info: USING ARITHMETIC MEAN TO COMBINE L-J SIGMA PARAMETERS
yyy.
zzz. Warning: DUPLICATE ANGLE ENTRY FOR HA-CT2-NC2
aaaa. PREVIOUS VALUES k=51.5 theta=107.5 k_ub=0 r_ub=0
bbbb. USING VALUES k=51.5 theta=112.05 k_ub=0 r_ub=0
cccc.
dddd. Warning: DUPLICATE DIHEDRAL ENTRY FOR CT1-CT2-NC2-C
eeee. PREVIOUS VALUES MULTIPLICITY: 1
fff. k=0 n=6 delta=180
ggg. INCREASING MULTIPLICITY TO: 2
hhh. k=12 n=1 delta=0
iiii. Info: SUMMARY OF PARAMETERS:
jjjj. Info: 256 BONDS
kkkk. Info: 655 ANGLES
llll. Info: 1096 DIHEDRAL
mmmm. Info: 80 IMPROPER
nnnn. Info: 0 CROSSTERM
oooo. Info: 130 VDW
pppp. Info: 0 VDW_PAIRS
qqqq. Warning: Ignored 506 bonds with zero force constants.
rrrr. Warning: Will get H-H distance in rigid H2O from H-O-H angle.
ssss. Warning: Ignored 1012 angles with zero force constants.
tttt. Info: TIME FOR READING PSF FILE: 4.83474
uuuu. Info: TIME FOR READING PDB FILE: 0.620816
vvvv. Info:
wwwww. Info: *****
xxxx. Info: STRUCTURE SUMMARY:
yyyy. Info: 165887 ATOMS
zzzz. Info: 165019 BONDS
aaaaa. Info: 274356 ANGLES
bbbbb. Info: 393068 DIHEDRALS
cccc. Info: 14948 IMPROPER
dddd. Info: 0 CROSSTERMS
eeeee. Info: 0 EXCLUSIONS
ffff. Info: 4 FIXED ATOMS

```

gggggg. Info: 80838 RIGID BONDS
hhhhhh. Info: 0 RIGID BONDS BETWEEN FIXED ATOMS
iiiiii. Info: 416811 DEGREES OF FREEDOM
jjjjjj. Info: 93585 HYDROGEN GROUPS
kkkkkk. Info: 4 ATOMS IN LARGEST HYDROGEN GROUP
llllll. Info: 93585 MIGRATION GROUPS
mmmmmm. Info: 4 ATOMS IN LARGEST MIGRATION GROUP
nnnnnn. Info: 4 HYDROGEN GROUPS WITH ALL ATOMS FIXED
oooooo. Info: TOTAL MASS = 1.41674e+06 amu
pppppp. Info: TOTAL CHARGE = -2373.99 e
qqqqqq. Info: *****
rrrrrr. Info:
ssssss. Info: Entering startup at 5.91633 s, 53.9446 MB of memory in use
tttttt. Info: Startup phase 0 took 0.030149 s, 53.9452 MB of memory in use
uuuuuu. Info: Startup phase 1 took 1.74704 s, 105.634 MB of memory in use
vvvvvv. Info: Startup phase 2 took 0.0319819 s, 106.903 MB of memory in use
wwwwww. Info: PATCH GRID IS 10 BY 8 BY 8
xxxxxx. Info: PATCH GRID IS 1-AWAY BY 1-AWAY BY 1-AWAY
yyyyyy. Info: REMOVING COM VELOCITY -0.000648275 -0.00538416 0.0127163
zzzzzz. Info: LARGEST PATCH (34) HAS 1085 ATOMS
aaaaaaa. Info: Startup phase 3 took 0.287054 s, 133.307 MB of memory in use
bbbbbbb. Info: Startup phase 4 took 0.03195 s, 133.307 MB of memory in use
ccccccc. Info: Startup phase 5 took 0.064013 s, 114.37 MB of memory in use
ddddddd. LDB: Measuring processor speeds ...Namd Central LB beign created...
eeeeeee. Done.
ffffff. Info: Startup phase 6 took 1.27702 s, 114.496 MB of memory in use
ggggggg. Info: CREATING 12233 COMPUTE OBJECTS
hhhhhhh. Info: useSync: 1 useProxySync: 0
iiiiiii. Info: NONBONDED TABLE R-SQUARED SPACING: 0.0625
jjjjjjj. Info: NONBONDED TABLE SIZE: 769 POINTS
kkkkkkk. Info: ABSOLUTE IMPRECISION IN FAST TABLE ENERGY: 1.69407e-21 AT 11.9974
lllllll. Info: RELATIVE IMPRECISION IN FAST TABLE ENERGY: 1.13046e-16 AT 11.9974
mmmmmmm. Info: Startup phase 7 took 0.047992 s, 121.997 MB of memory in use
nnnnnnn. Info: Startup phase 8 took 0.000905991 s, 140.543 MB of memory in use
ooooooo. Info: Finished startup at 9.43443 s, 140.543 MB of memory in use
ppppppp. REINITIALIZING VELOCITIES AT STEP 0 TO 300 KELVIN.
qqqqqqq. TCL: Running for 50000 steps
rrrrrrr. PRESSURE: 0 0 0 0 0 0 0 0 0
sssssss. GPRESSURE: 0 0 0 0 0 0 0 0 0
ttttttt. ETITLE: TS BOND ANGLE DIHED IMPRP ELECT VDW BOUNDARY
uuuuuuu. MISC KINETIC TOTAL TEMP POTENTIAL TOTAL3 TEMPAVG
vvvvvvv.
wwwwwww. ENERGY: 0 18240.5607 65818.2058 106799.1535 1037.8143 -585264.3090 -5329.2366
0.0000 0.0000 124095.6856 -274602.1257 299.6456 -398697.8113 -274587.7688 299.6456
xxxxxxx.
yyyyyyy. LDB: ===== START OF LOAD BALANCING ===== 36.5336
zzzzzzz. LDB: ===== END OF LOAD BALANCING ===== 36.5337
aaaaaaaa.
bbbbbbbb. Info: Initial time: 4 CPUs 0.537089 s/step 3.10816 days/ns 209.064 MB memory
ccccccc. LDB: ===== START OF LOAD BALANCING ===== 63.8581
ddddddd. LDB: TIME 63.8654 LOAD: AVG 25.5331 MAX 27.3813 PROXIES: TOTAL 219 MAXPE 73 MAXPATCH 1 None
2.71964
eeeeeee. LDB: TIME 64.0314 LOAD: AVG 25.5331 MAX 30.6397 PROXIES: TOTAL 384 MAXPE 165 MAXPATCH 1
TorusLB 2.71964
ffffff. LDB: TIME 74.3573 LOAD: AVG 25.5331 MAX 26.8071 PROXIES: TOTAL 384 MAXPE 165 MAXPATCH 1
TorusLB 2.71964
ggggggg. LDB: ===== END OF LOAD BALANCING ===== 74.4065
hhhhhhh.
iiiiiii. PRESSURE: 100 0 0 0 0 0 0 0 0
jjjjjjj. GPRESSURE: 100 0 0 0 0 0 0 0 0
kkkkkkk. PRESSAVG: 100 0 0 0 0 0 0 0 0
lllllll. GPRESSAVG: 100 0 0 0 0 0 0 0 0
mmmmmmm. Info: Initial time: 4 CPUs 0.544343 s/step 3.15013 days/ns 213.06 MB memory
nnnnnnn. ENERGY: 100 38999.9310 104642.9469 114980.5386 2841.7992 -564108.4577 -4643.9813
0.0000 0.0000 90434.2094 -216853.0138 218.3655 -307287.2232 -216186.3870 191.5312
ooooooo.
ppppppp. LDB: ===== START OF LOAD BALANCING ===== 100.749
qqqqqqq. LDB: TIME 100.756 LOAD: AVG 25.036 MAX 26.1483 PROXIES: TOTAL 219 MAXPE 73 MAXPATCH 1 None
2.57308
rrrrrrr. LDB: TIME 100.874 LOAD: AVG 25.036 MAX 26.1483 PROXIES: TOTAL 384 MAXPE 165 MAXPATCH 1
RefineTorusLB 2.57308
sssssss. LDB: ===== END OF LOAD BALANCING ===== 100.876
ttttttt.
uuuuuuu. Info: Initial time: 4 CPUs 0.52125 s/step 3.01649 days/ns 213.772 MB memory
vvvvvvv. LDB: ===== START OF LOAD BALANCING ===== 126.962

```

wwwwww. LDB: TIME 126.97 LOAD: AVG 24.7837 MAX 25.9321 PROXIES: TOTAL 219 MAXPE 73
MAXPATCH 1 None 2.4963
xxxxxxx. LDB: TIME 127.087 LOAD: AVG 24.7837 MAX 25.9321 PROXIES: TOTAL 384 MAXPE 165 MAXPATCH 1
RefineTorusLB 2.4963

.
. .
. .

yyyyyyy. PRESSURE: 50000 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
zzzzzzz. GPRESSURE: 50000 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
aaaaaaaaa. PRESSAVG: 50000 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
bbbbbbbbb. GPRESSAVG: 50000 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
cccccccc. TIMING: 50000 CPU: 23603.1, 0.464003/step Wall: 25735.2, 0.509527/step, 0 hours remaining, 245.691345
MB of memory in use.

ddddddd. ETITLE: TS BOND ANGLE DIHED IMPRP ELECT VDW BOUNDARY
MISC KINETIC TOTAL TEMP POTENTIAL TOTAL3 TEMPAVG

eeeeeeee. ENERGY: 50000 45410.2233 119115.2670 115445.5748 3456.1734 -601144.1752 -2608.6312
ffffff. 0.0000 0.0000 123750.6060 -196574.9619 298.8124 -320325.5679 -195235.2974 299.5320

gggggggg. hhhhhhhh. WRITING EXTENDED SYSTEM TO RESTART FILE AT STEP 50000
iiiiiiii. WRITING COORDINATES TO DCD FILE AT STEP 50000
jjjjjjjj. WRITING COORDINATES TO RESTART FILE AT STEP 50000
kkkkkkkk. FINISHED WRITING RESTART COORDINATES
llllllll. WRITING VELOCITIES TO RESTART FILE AT STEP 50000
mmmmmmmm. FINISHED WRITING RESTART VELOCITIES
nnnnnnnn. WRITING EXTENDED SYSTEM TO OUTPUT FILE AT STEP 50000
oooooooo. WRITING COORDINATES TO OUTPUT FILE AT STEP 50000
pppppppp. CLOSING COORDINATE DCD FILE
qqqqqqqq. WRITING VELOCITIES TO OUTPUT FILE AT STEP 50000
rrrrrrrr. =====
ssssssss.
ttttttt. WallClock: 25745.853516 CPUTime: 23611.722656 Memory: 227.286957 MB
uuuuuuuu.

Συμπεριλαμβάνονται μόνο οι κυριότεροι όροι και οι σημαντικότερες έννοιες.

αγγελιοφόρο RNA (mRNA) [messenger RNA (mRNA)] Μόριο RNA που αποτελεί προϊόν μεταγραφής του DNA και περιέχει την απαραίτητη γενετική πληροφορία για την κωδίκευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

άγριος (ή φυσικός) τύπος (wild type) Στέλεχος μικροοργανισμού που έχει απομονωθεί στη φύση. Η συνήθης ή φυσική μορφή ενός γονιδίου ή μικροοργανισμού.

αλληλουχία Shine-Dalgarno, θέση δέσμευσης ριβοσώματος (Shine-Dalgarno sequence) Αλληλουχία λίγων νουκλεοτιδίων του προκαρυωτικού mRNA, που βρίσκεται σε ανιούσα θέση ως προς τη θέση έναρξης της μετάφρασης. Η αλληλουχία Shine-Dalgarno συνδέεται με το ριβοσωματικό RNA και έτσι οδηγεί το ριβόσωμα στο κωδικόνιο λήξης του mRNA.

αναερόβιος (anaerobe) Οργανισμός που αναπτύσσεται απουσία O₂. Για κάποιους αναερόβιους οργανισμούς, μάλιστα, το O₂ είναι τοξικό.

αναλογία βάσεων G + C (G + C base ratio) Το ποσοστό του ολικού νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA) ενός οργανισμού που αποτελείται από ζεύγη βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης (εκφρασμένο ως mol % G + C).

αντιβιοτικό (antibiotic) Χημικός παράγοντας που συντίθεται από έναν οργανισμό και είναι επιβλαβής για άλλους οργανισμούς.

αντιβιοτικό ευρέος φάσματος (broad-spectrum antibiotic) Αντιβιοτικό που επενεργεί τόσο στα θετικά Gram, όσο και στα αρνητικά Gram.

αποικία (colony) Μακροσκοπικά ορατός πληθυσμός κυττάρων που αναπτύσσονται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου, τα οποία προέρχονται από το ίδιο μεμονωμένο αρχικό κύτταρο.

Βακτήρια (Bacteria) Όλοι οι προκαρυώτες που δεν ανήκουν στο «χώρο» των *Αρχαίων*.

βακτηριοκτόνο (bacteriocidal) Χημική ένωση ή παράγοντας ικανός να σκοτώνει βακτήρια.

βακτηριοσίνες (bacteriocins) Παράγοντες που απελευθερώνονται από ορισμένα βακτήρια και θανατώνουν συγγενικά είδη βακτηρίων και καταστέλλουν την ανάπτυξη τους.

βακτηριοστατικός (bacteriostatic) Παράγοντας που έχει την ικανότητα να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, αλλά όχι να τα θανατώνει.

γονίδιο (gene) Η μονάδα κληρονομικότητας · το τμήμα του DNA που καθορίζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή μια αλυσίδα πολυπεπτιδίου, το tRNA ή το rRNA.

δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) [deoxyribonucleic acid (DNA)] Πολυμερές νουκλεοτιδίων που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός δομικού σκελετού δεοξυριβοζικών σακχάρων. Συνιστά το γενετικό υλικό των κυττάρων και ορισμένων ιών.

in silico Η χρήση υπολογιστών για τη διεκπεραίωση πολύπλοκων αναλύσεων.

in vitro Στο δοκιμαστικό σωλήνα, εκτός ζωντανού οργανισμού.

in vivo Στο ζωντανό σώμα ενός οργανισμού.

κωδικόνιο (codon) Αλληλουχία τριών βάσεων στο αγγελιοφόρο RNA, που κωδικεύει ένα συγκεκριμένο αμινοξύ.

μετάλλαγμα, μεταλλαγμένο στέλεχος (mutant) Κλώνος που διαφέρει από το γονικό κύτταρο εξαιτίας κάποιας μετάλλαξης.

μετάλλαξη, μεταλλαγή (mutation) Κληρονομήσιμη αλλαγή της αλληλουχίας βάσεων στο γονιδίωμα ενός οργανισμού.

μεταφορικό RNA (tRNA) [transfer RNA (tRNA)] Είδος RNA που μεταφέρει αμινοξέα στα ριβοσώματα κατά τη μετάφραση · περιέχει το αντικωδικόνιο.

μετάφραση (translation) Διαδικασία πρωτεϊνοσύνθεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ως μήτρα η γενετική πληροφορία του αγγελιοφόρου RNA.

μόριο (molecule) Δύο ή περισσότερα άτομα χημικά συνδεδεμένα μεταξύ τους.

πεπτιδικός δεσμός (peptide bond) Είδος ομοιοπολικού δεσμού που συνδέει τα αμινοξέα σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

πολυμερές (polymer) Μεγάλο μόριο που σχηματίζεται από τον πολυμερισμό μονομερών μονάδων.

πολυπεπτίδιο (polypeptide) Αρκετά αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς.

προκαρυώτης (prokaryote) Κύτταρο ή οργανισμός που δεν έχει πυρήνα.

πρωτεΐνη (protein) Πολυμερές μόριο που αποτελείται από ένα ή δύο πολυπεπτίδια.

ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) [ribonucleic acid (RNA)] Πολυμερές αποτελούμενο από νουκλεοτίδια, τα οποία συνδέονται σε ένα σκελετό φωσφορικής ριβόζης. Συμμετέχει σε πολλές διεργασίες, όπως π.χ. στη σύνθεση πρωτεϊνών, ή λειτουργεί ως γενετικό υλικό ορισμένων ιών.

ριβόσωμα (ribosome) Κυτταροπλασματικό σωματίο που αποτελείται από ριβοσωματικό RNA και πρωτεΐνες. Αποτελεί τμήμα του μηχανισμού πρωτεϊνοσύνθεσης των κυττάρων.

ριβοσωματικό RNA (rRNA) [ribosomal RNA (rRNA)] Το είδος του RNA που απαντά στα ριβοσώματα. Μερικά από τα rRNA συμμετέχουν ενεργά στη σύνθεση πρωτεϊνών.

rRNA 16S (16S rRNA) Μόρια RNA μήκους 1500 νουκλεοτιδίων, που εμπεριέχεται στη μικρή υπομονάδα των προκαρυωτικών ριβοσωμάτων των *Βακτηρίων* και των *Αρχαίων*. Από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του rRNA 16S μπορούν να συναχθούν εξελικτικά συμπεράσματα. Το αντίστοιχο (ομόλογο) τμήμα των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι το rRNA 18S.

στέλεχος (strain) Κύτταρα που ανήκουν στο ίδιο είδος αλλά φέρουν κάποιες τροποποιήσεις στο γονιδίωμα.

Svedberg μονάδες (S) Συντελεστής καταβύθισης.

χρώση κατά Gram Δοκιμασία χρώσης που εφαρμόζεται ευρύτατα στη βακτηριολογία. Τα θετικά κατά Gram αποκτούν ιώδες χρώμα, ενώ τα αρνητικά κατά Gram ρόδινο-ερυθρό. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στη διαφορά δομής του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, η οποία επιτρέπει την αιθανόλη να αποχρωματίζει μόνο τα αρνητικά κατά Gram και όχι τα θετικά κατά Gram κύτταρα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για την άριστη συνεργασία που είχαμε, την προσοχή που επιδείκνυε, τις συμβουλές που μου έδινε κάθε φορά που αντιμετώπιζα κάποιο πρόβλημα με την πτυχιακή μου εργασία καθώς και τον χρόνο που αφιέρωσε για να μου λύνει οποιαδήποτε απορία που μου δημιουργούταν. Επιπλέον δε τους συνεπιβλέποντες μου καθηγητές, κ. Μ. Κοντού καθώς και τον κ. Δ. Λεωνίδα, επιπλέον δε την κ. Ε. Πετεινάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Τομέας Κλινικοεργαστηριακός, η οποία μας παραχώρησε τις μεταλλάξεις. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Τζιαστούδη για την συμβολή της στη δημιουργία της λινεζολίδης, τον Νίκο Νικολεουσάκο για τη βοήθεια για να έρθει εις πέρας η πτυχιακή μου εργασία, τη συμφοιτήτρια μου Βίκυ Στάθη και το Θωμά Πλάκα με τους οποίους ήμασταν στην ίδια ομάδα εκπόνησης διπλωματικών και είχαμε άριστη συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που είναι αρωγοί στην προσπάθειά μου όλα αυτά τα χρόνια!

Βιβή σε ευχαριστώ που είσαι δίπλα μου...

