



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σχέση των μεταλλάξεων U2504A και G2576U στο
23s rRNA από *Staphylococcus epidermidis* με την
αντίσταση στο αντιβιοτικό λινεζολίδη.
Μελέτη με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

Θωμάς Δ. Πλάκας

Λάρισα
2011



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γεώργιος Παπαδόπουλος: Λέκτορας Βιοφυσικής

Συνεπιβλέπων Καθηγητής:

Δημήτριος Λεωνίδας: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Συνεπιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Μαρία Κοντού: Λέκτορας Κλινικής Χημείας

Επιμέλεια:

Θωμάς Δ. Πλάκας

Λάρισα
2011

Περιεχόμενα:

Πρόλογος	4
Περίληψη	7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο:Θεωρητικό Μέρος

1.1 Staphylococcus epidermidis	8
1.2 Βιοσύνθεση Πρωτεϊνών	9
1.2.1 Ριβόσωμα	9
1.2.2 Στάδια πρωτεϊνοσύνθεσης	10
1.3 Αντιβιοτικά	11
1.3.1 Οξαζολιδιόνες	13
1.3.2 Λινεζολίδη	13
1.3.3 Μεταλλαγμένα στελέχη	16
1.4 Μοριακή Δυναμική	17
1.4.1 Διαδικασία μιας προσομοίωσης	20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο:Πειραματικό Μέρος

2.1 Στέλεχος αγρίου τύπου με προσθήκη λινεζολίδης	22
2.1.1 Τεμαχισμός/Προετοιμασία του συστήματος	23
2.1.2 Δημιουργία του αρχείου psf και pdb με τα υδρογόνα	24
2.1.3 Ενυδάτωση μορίου	25
2.1.4 Προσθήκη ιόντων	25
2.1.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας	26
2.1.6 Εξισορρόπηση	27
2.1.7 Τελική ελαχιστοποίηση	28
2.1.8 Υπολογισμός του RMSD	28
2.2 50S υπομονάδα μεταλλαγμένου στελέχους(U2504A) με προσθήκη λινεζολίδης	29
2.3 50S υπομονάδα μεταλλαγμένου στελέχους(G2576U) με προσθήκη λινεζολίδης	30
2.4 Συμπέρασμα	30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο:Αποτελέσματα/Σχολιασμός αποτελεσμάτων

3.1 Τιμές RMSD	31
3.2 Ενεργειακές τιμές	32
3.3 Αλληλεπίδραση λινεζολίδης-23S rRNA στα 3 στελέχη που μελετήθηκαν	34
3.4 Συμπέρασμα	36
Βιβλιογραφία	38
Παράρτημα	40
Γλωσσάριο	51
Ευχαριστίες	53

Πρόλογος:

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και θανατώνουν άλλους μικροοργανισμούς ή αναστέλλουν την ανάπτυξή τους. Είναι προϊόντα του μεταβολισμού τους και σήμερα ορισμένα από αυτά παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σε βιοαντιδραστήρες. Πολλά από αυτά μπορούν να συντεθούν και χημικά, αλλά η διαδικασία είναι τόσο ακριβή και επίπονη που δεν μπορεί να συγκριθεί σε κόστος με την παραγωγή από βακτήρια και από μύκητες. Η παγκόσμια χρήση των αντιβιοτικών για την καταπολέμηση των μικροβίων έχει βελτιώσει σημαντικά την υγεία των ανθρώπων και έχει σώσει εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές.

Έως σήμερα έχουν απομονωθεί από διάφορους μικροοργανισμούς, περισσότερα από 8.000 αντιβιοτικά με ποικίλους τρόπους δράσης.

Υπολογίζεται ότι αρκετές εκατοντάδες νέα αντιβιοτικά ανακαλύπτονται κάθε χρόνο ύστερα από εντατική έρευνα κατά την οποία ελέγχονται χιλιάδες διαφορετικοί μικροοργανισμοί, για να βρεθούν εκείνοι που παράγουν νέα αντιβιοτικά.

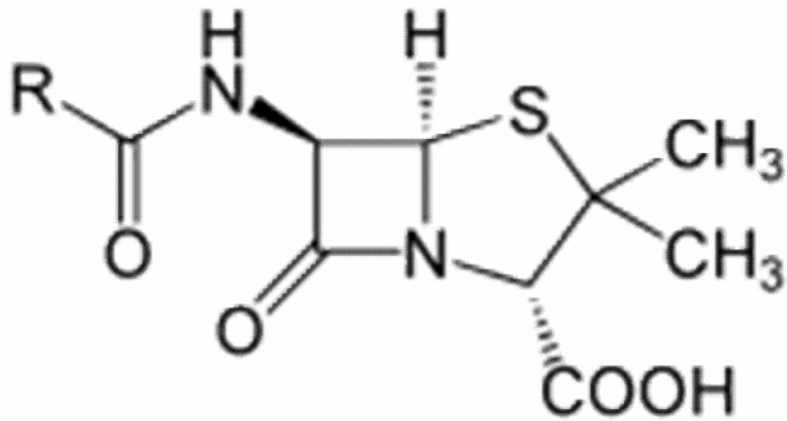
Η πρώτη ανακάλυψη αντιβιοτικού έγινε τυχαία από τον Alexander Fleming το 1926, όταν κάποιες καλλιέργειες μικροβίων καταστρέφονταν ενώ έρχονταν σε επαφή με μύκητες του γένους *Penicillium*. Το αντιβιοτικό όμως δεν απομονώθηκε. Η απομόνωσή του έγινε αργότερα γύρω στο 1940. Το 1944 στη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου άρχισε η χρήση του. Αργότερα ανακαλύφθηκαν και άλλα αντιβιοτικά όπως η στρεπτομυκίνη και οι τετρακυκλίνες. Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών επέφερε επανάσταση στη θεραπεία των λοιμώξεων και έδωσε ελπίδες στον ιατρικό κόσμο ότι σύντομα θα ήταν δυνατή η καταπολέμησή τους. Ξήντα και πλέον χρόνια μετά την ανακάλυψη των πρώτων αντιβιοτικών, και παρόλο ότι έχουν ανακαλυφθεί πολύ ισχυρά αντιβιοτικά, οι λοιμώξεις δεν έχουν εκλείψει. Τα τελευταία χρόνια η βακτηριακή αντοχή άρχισε να παίρνει εκρηκτικές διαστάσεις. Τα βακτήρια κατορθώνουν με διάφορους τρόπους να δημιουργούν αντοχή στα αντιβιοτικά φάρμακα με ρυθμούς πιο γρήγορους από ότι η επιστήμη ανακαλύπτει νέα αποτελεσματικά αντιβιοτικά φάρμακα.

Ορισμένες φορές μία μόνο μετάλλαξη στο βακτηριακό γονιδίωμα είναι αρκετή έτσι ώστε να τους δώσει την παραπάνω ικανότητα. Η αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου και του βακτηριακού 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 να αξιοποιήσει τις νέες δυνατότητες που προσφέρει η έρευνα του γονιδιώματος.

Σε αυτή τη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δομής-διαμόρφωσης του 23s rRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος του είδους *Staphylococcus epidermidis* αγρίου τύπου(+ λινεζολίδη) με το 23s rRNA του ίδιου είδους με μετάλλαξη U2504A(+λινεζολίδη), καθώς και με το 23s rRNA πάλι του ίδιου είδους με μετάλλαξη G2576U(+λινεζολίδη). Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής, μια μέθοδος η οποία κατατάσσεται στις θεωρητικές ή υπολογιστικές μεθόδους. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της γίνεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω της βοήθειας ειδικών προγραμμάτων.

Η παρούσα διπλωματική εργασία θα χωριστεί σε τρεις ενότητες οι οποίες και αφορούν το θεωρητικό μέρος, το πειραματικό μέρος καθώς και τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων της διπλωματικής εργασίας.



Εικόνα 1. Πενικιλίνη, το πρώτο φυσικό αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming

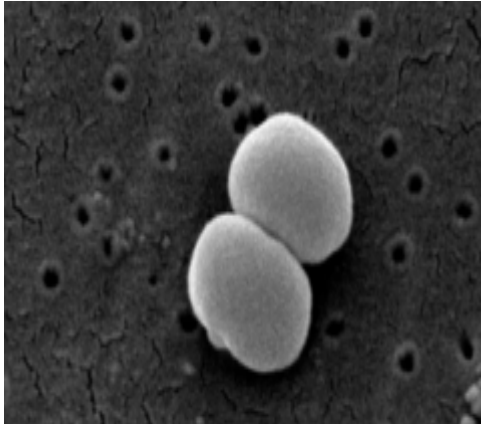
Η κατάχρηση αντιβιοτικών κάνει τα μικρόβια πιο ανθεκτικά.... αντί να τα σκοτώνει!

Περίληψη:

Κλινικές παρατηρήσεις του Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του Σισμανόγλειου Νοσοκομείου στην Αθήνα έδειξαν την ανθεκτικότητα έναντι της λινεζολίδης στελεχών του *Staphylococcus epidermidis* στα οποία εντοπίστηκαν οι σημειακές μεταλλάξεις U2504A και G2576U 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 φαίνεται να δικαιολογείται σε αρκετά μεγάλο βαθμό η ανθεκτικότητα της μετάλλαξης U2504A και της μετάλλαξης G2576U, λόγω ασταθέστερης αλληλεπίδρασης της 50S υπομονάδας με την λινεζολίδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο:Θεωρητικό Μέρος

1.1 Staphylococcus epidermidis



Βασίλειο: *Βακτήρια*

Φύλο: *Firmicutes*

Κλάση: *Βακίλλων*

Τάξη: *Bacillales*

Οικογένεια: *Staphylococcaceae*

Γένος: *Σταφυλόκοκκος*

Είδος: *Επιδερμικός σταφυλόκοκκος*

Ο *Staphylococcus epidermidis* είναι ένας προαιρετικά αερόβιος οργανισμός με μικρούς (περίπου 1μm στη διάμετρο) gram θετικούς κόκκους που εμφανίζονται μεμονωμένοι, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες και έχουν μια ισχυρή τάση να δημιουργούν συσσωματώματα, εξ ου και η ονομασία σταφυλόκοκκος, από το «ελληνικό τσαμπί σταφύλια» και το «coccus (κόκκος)» [1].

Είναι ένα από τα 33 γνωστά είδη που ανήκουν στο γένος του *Staphylococcus*. Ο Friedrich Julius Rosenbach (1884) διέκρινε τον *Staphylococcus epidermidis* από τον *Staphylococcus aureus* (κίτρινο), ονομάζοντάς τον αρχικά σαν *Staphylococcus albus* (λευκό) [2].

Ο *Staphylococcus epidermidis* αποτελεί μέρος της φυσικής χλωρίδας του ανθρώπου και μπορεί να ανιχνευθεί σε βλεννογόνους μεμβράνες και στο δέρμα, ενώ αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ο *Staphylococcus epidermidis* έχει την ικανότητα να σχηματίζει πολυστρωματικές βιομεμβράνες (biofilms) σε αδρανή αντικείμενα, όπως ενδοφλέβιους καθετήρες, αρθρώσεις και άλλες πλαστικές ιατρικές συσκευές. Όταν βρίσκεται 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 [3].

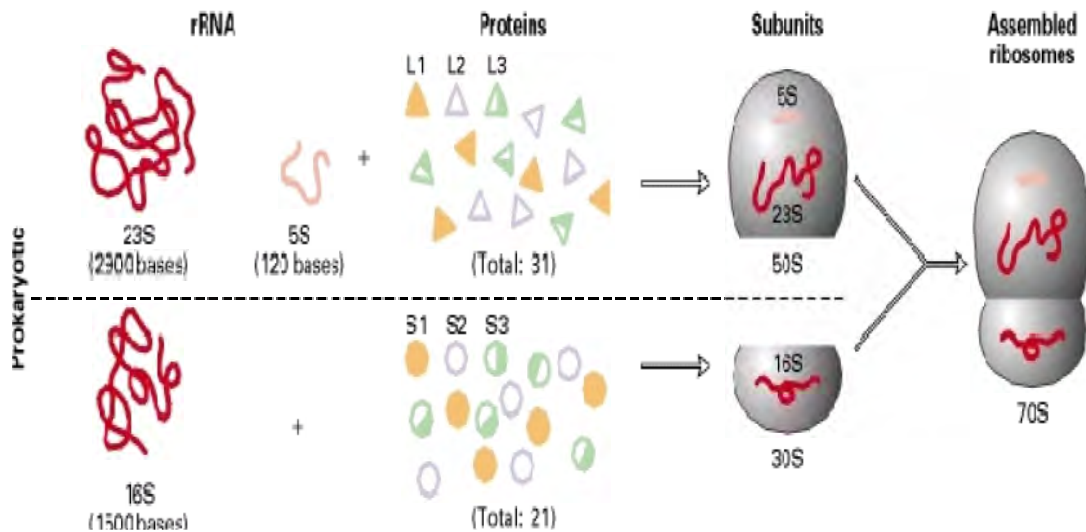
Είναι γνωστό ότι η λινεζολίδη παρεμβαίνει στην βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Γι αυτό, προκειμένου να γίνει κατανοητή η σκοπιμότητα αυτής της εργασίας αφιερώνονται οι επόμενες τρεις ενότητες σ' αυτήν την κυτταρική λειτουργία.

1.2 Βιοσύνθεση Πρωτεϊνών

Μία πρωτεΐνη συντίθεται με κατεύθυνση από το αμινο-τελικό προς το καρβοξυ-τελικό άκρο με τη διαδοχική προσθήκη αμινοξέων στο καρβοξυ-τελικό άκρο της αυξανόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Τα αμινοξέα φθάνουν στην αυξανόμενη αλυσίδα με μία ενεργοποιημένη μορφή ως αμινοακυλο-tRNA, τα οποία δημιουργούνται με την ένωση της καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με το 3'-άκρο ενός μορίου tRNA. Η σύνδεση ενός αμινοξέος με το αντίστοιχο του tRNA καταλύεται από μία συνθετάση του αμινοακυλο- tRNA. Η διάσπαση της ATP ωθεί αυτή την αντίδραση ενεργοποίησης. Για κάθε αμινοξύ υπάρχει συνήθως ένα ενεργοποιητικό ένζυμο και τουλάχιστον ένα είδος tRNA [4].

1.2.1 Ριβόσωμα

Η σύνθεση των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα (ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια τα οποία κατά 2/3 αποτελούνται από RNA και κατά 1/3 από πρωτεΐνες) που συγκροτούνται από υπομονάδες 30S (μονάδες Svedberg) και 50S. Η υπομονάδα 30S αποτελείται από rRNA 16S και 21 διαφορετικές πρωτεΐνες ενώ η υπομονάδα 50S αποτελείται από rRNA 23S και 5S και 31 διαφορετικές πρωτεΐνες. Η δομή σχεδόν όλων των συστατικών των ριβοσωμάτων έχει προσδιοριστεί περίπου στο επίπεδο ατομικής διακριτικής ικανότητας [4]. 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» [5].



Εικόνα 2. Το ριβόσωμα (70S) συγκροτείται από τις υπομονάδες 50S και 30S. Η υπομονάδα 50S αποτελείται από 23S ριβοσωματικό RNA, 5S ριβοσωματικό RNA και 31 πρωτεΐνες. Η υπομονάδα 30S αποτελείται από 16S ριβοσωματικό RNA και 21 πρωτεΐνες [6].

1.2.2 Στάδια πρωτεϊνοσύνθεσης:

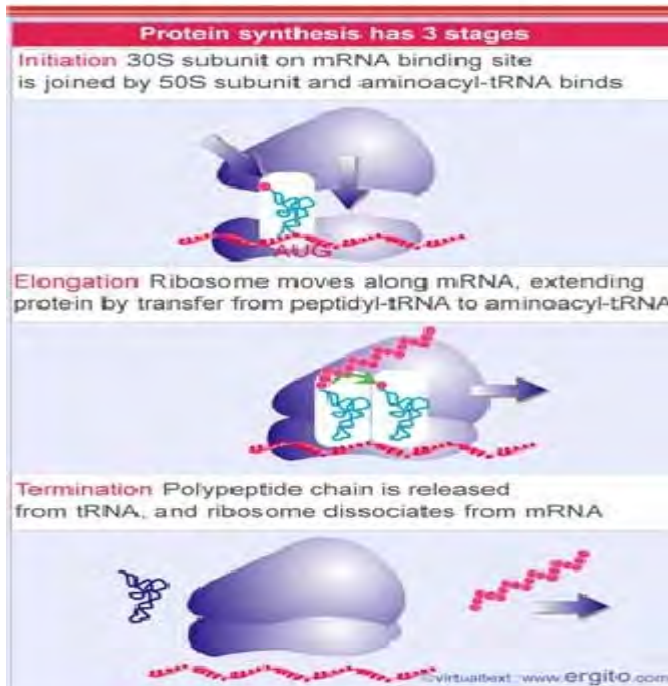
Εκκίνηση: Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η εκκίνηση ξεκινά πάντοτε με μια ελεύθερη ριβοσωματική υπομονάδα 30S και τον σχηματισμό ενός συμπλόκου εκκίνησης, το οποίο αποτελείται από τη ριβοσωματική υπομονάδα 30S, το mRNA, το tRNA της φορμυλομεθειονίνης και άλλους παράγοντες εκκίνησης. Στο στάδιο αυτό απαιτείται η παρουσία τριφωσφορικής γουανοσίνης. Στο παραπάνω σύμπλοκο προστίθεται μια ριβοσωματική υπομονάδα 50S και σχηματίζεται το ενεργό ριβόσωμα 70S. Μετά το πέρας της μεταφραστικής διαδικασίας, το ριβόσωμα απελευθερώνεται και δίσταται πάλι σε δύο υπομονάδες μια των 30S και άλλη μια των 50S. Πριν από το κωδικόνιο εκκίνησης στο mRNA βρίσκεται μια αλληλουχία μήκους 3 έως 9 νουκλεοτιδίων, η αλληλουχία Shine-Dalgarno. Η αλληλουχία Shine-Dalgarno είναι συμπληρωματική προς το 3-ακρο του 16S rRNA. 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 φορμυλομεθειονίνης. Στη συνέχεια, η φορμυλομάδα απομακρύνεται από το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου, επομένως το πρώτο αμινοξύ μιας ολοκληρωμένης πρωτεΐνης είναι πάντοτε μια μεθειονίνη [7].

Επιμήκυνση-Τερματισμός: 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 (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 πεπτιδίο 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 πεπτιδίο πρέπει τώρα να μετατοπιστεί από τη θέση A στη θέση P, απελευθερώνοντας έτσι τη θέση A για ένα άλλο AA-tRNA. Το μόριο tRNA που συγκρατούσε το πρώτο από τα δύο αμινοξέα του πεπτιδίου μετατοπίζεται στη θέση E (exit). Η διαδικασία αυτή (2 μετατοπίσεις tRNA από τη θέση P στη θέση E και από τη θέση A στη θέση P) επαναλαμβάνεται συνέχεια μέχρις ότου το ριβόσωμα αφιχθεί σε ένα κωδικόνιο που δεν ορίζει κάποιο αμινοακυλο- tRNA, δηλαδή σε ένα **κωδικόνιο τερματισμού**. Κανένα tRNA δεν δεσμεύεται σε κωδικόνιο τερματισμού. Μερικές πρωτεΐνες που ονομάζονται παράγοντες απελευθέρωσης αναγνωρίζουν το σήμα τερματισμού της αλυσίδας και αποκολλούν το προσδεδεμένο πολυπεπτιδίο από το τελικό tRNA, απελευθερώνοντας την πλήρη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, το ριβόσωμα δίσταται και οι δύο υπομονάδες του είναι ελεύθερες να συγκροτήσουν νέα σύμπλοκα εκκίνησης [7].

1.3 Αντιβιοτικά

Αρχικά, σαν αντιβιοτικά ορίστηκαν τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που παράγονται με βιοσυνθετική μέθοδο (καλλιέργειες μικροβίων). Επειδή όμως ο τομέας παραγωγής απέκτησε μεγάλη ευρύτητα (μικροβιοκτόνα-αντιβιοτικά, κυτταροστατικά-αντιβιοτικά, διάφορα αντιβιοτικά) επεκράτησε να ονομάζονται αντιβιοτικά οι βιοσυνθετικώς παραγόμενες αντιμικροβιακές ουσίες [9].

Τα αντιβιοτικά διαιρούνται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, τα βακτηριοκτόνα και τα βακτηριοστατικά. Βακτηριοκτόνα ονομάζονται όταν οι συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στο αίμα υπερβαίνουν συνήθως την ελάχιστη βακτηριοκτόνο πυκνότητα για τα πιο κοινά παθογόνα ενώ βακτηριοστατικά όταν οι συγκεντρώσεις στο αίμα υπερβαίνουν την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα, αλλά είναι μικρότερες



Εικόνα 3. Η πρωτεϊνοσύνθεση διακρίνεται σε 3 στάδια:

- 1) Έναρξη όπου η υπομονάδα 50S συνδέεται με το σύμπλοκο εκκίνησης.
- 2) Επιμήκυνση όπου το ριβόσωμα κινείται κατά μήκος του mRNA, καθώς τα αμινοξέα προστίθενται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και τα tRNA μετατοπίζονται από τη θέση P στη θέση A.
- 3) Τερματισμός όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα ελευθερώνεται από το tRNA και το ριβόσωμα αποσπάται από το mRNA [5] (αναπαραγωγή από Lewin B. *Genes VIII*, Ακαδημαϊκές εκδόσεις I. Μπασρδα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2004).

από την ελάχιστη βακτηριοκτόνο πυκνότητα.

Τα περισσότερα αντιβιοτικά έχουν ως στόχο τις βακτηριακές λειτουργίες και τις διαδικασίες ανάπτυξης. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες αντιβιοτικών που αναστέλλουν τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος είναι οι β-λακτάμες (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες) και τα γλυκοπεπτιδικά (βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη). Αντιβιοτικά τα οποία αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση είναι κυρίως βακτηριοστατικά (μακρολίδια, τετρακυκλίνες), εκτός από τις αμινογλυκοσίδες που είναι βακτηριοκτόνες. Τέλος, υπάρχουν και αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση του βακτηριακού RNA, αναστέλλοντας την DNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση, καθώς και αντιβιοτικά που αναστέλλουν την βιοσυνθετική οδό των φυλλικών οξέων (φυλλικό και φυλλινικό), απαραίτητοι συμπαράγοντες στη σύνθεση πουρινών και συνεπώς του DNA (σουλφοναμίδια, τριμεθοπρίμη) [10].

1.3.1 Οξαζολιδινόνες

Οι οξαζολιδινόνες είναι μία νέα ομάδα συνθετικών αντιβιοτικών που έχουν έναν ξεχωριστό μηχανισμό δράσης. Η κατηγορία αυτή των αντιβιοτικών με μοναδικό μέχρι στιγμής εκπρόσωπο την λινεζολίδα ασκεί την βακτηριοστατική της δράση, αναστέλλοντας την μικροβιακή πρωτεϊνική σύνθεση, συνδεδεμένη στην 50S ριβοσωματική υπομονάδα [11]. Έχουν δραστηριότητα έναντι μιας πληθώρας gram-θετικών βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων και των *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Η πρώτη οξαζολιδινόνη ανακαλύφθηκε και αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 από ερευνητές στην E.I du Pont Nemours and Company για παθήσεις φυτών. Το έτος 1987 δύο οξαζολιδινόνες που προέκυψαν από την ανάπτυξη του αρχικού μορίου, οι DuP-721 και DuP-105, επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη. Παρ' όλ' αυτά η ανάπτυξη της DuP-721 σταμάτησε λόγω της συγκεκριμένης τοξικότητας που παρουσιάστηκε σε πειραματόζωα. Στις αρχές του 1990 η Pharmacia and Upjohn προσπάθησαν να αναπτύξουν μια οξαζολιδινόνη με ασφαλές προφίλ και αντιμικροβιακό φάσμα παρόμοιο με εκείνο της βανκομυκίνης. Έτσι προέκυψε η λινεζολίδα, η πρώτη οξαζολιδινόνη που προχώρησε στο στάδιο των κλινικών μελετών με εξαιρετική αντιμικροβιακή δράση, ασφάλεια και φαρμακοκινητικές ιδιότητες [11].

1.3.2 Λινεζολίδα

Η λινεζολίδα από χημικής δομής είναι μία (S)-N-[[3-[3-φθόρο-4-μορφολινυλοφαίνυλο)-2-οξο-5-οξαζολιδίνυλο]μέθυλο] ακεταμίδη με μοριακό τύπο $C_{16}H_{20}FN_3O_4$ και M.B. 337.35 dalton.

Η λινεζολίδα έχει βακτηριοστατική δράση έναντι των σταφυλόκοκκων και εντερόκοκκων και βακτηριοκτόνο έναντι των στρεπτόκοκκων ανεξάρτητα από τα επίπεδα αντοχής. Η δράση της λινεζολίδης φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το μέγεθος του αρχικού ενοφθαλμισμού. Λόγω του μοναδικού μηχανισμού δράσης και της καθ'ολοκληρία συνθετικής φύσης του μορίου η διασταυρούμενη αντοχή της λινεζολίδης με άλλα αντιβιοτικά είναι απίθανη.

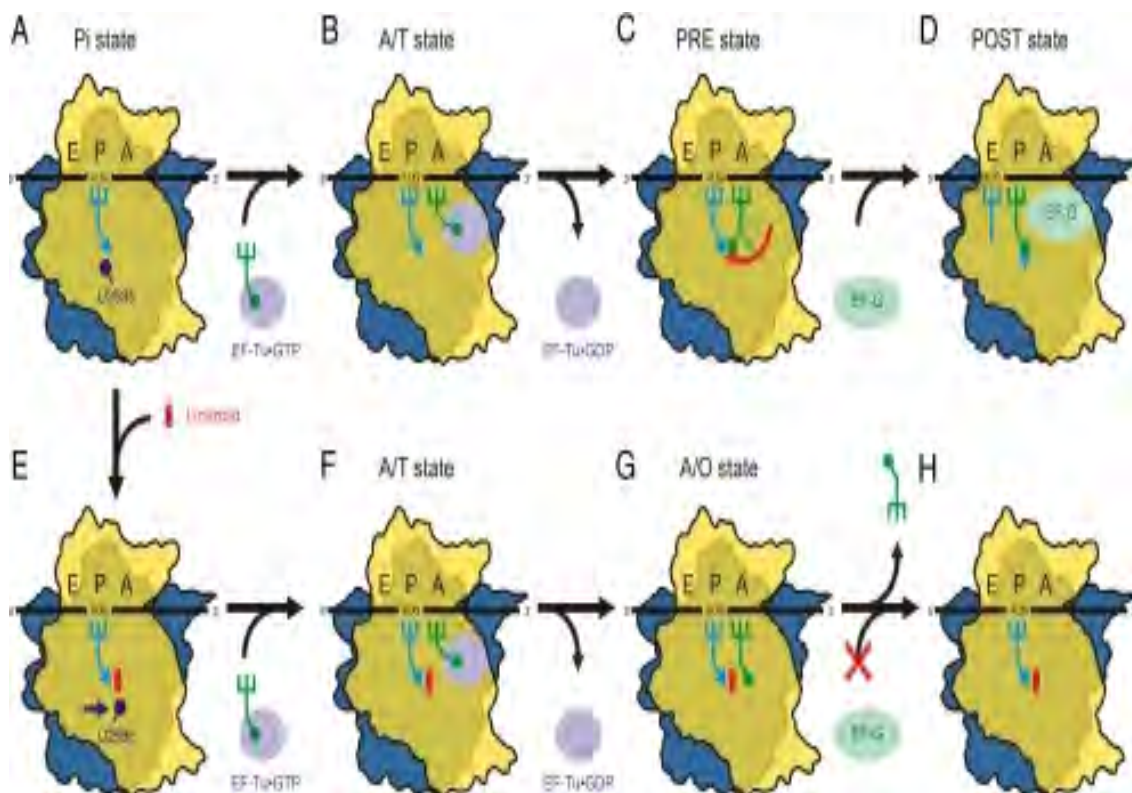
Βασιζόμενοι σε φαρμακοκινητικά δεδομένα οι Biedenbach και Jones (1997) πρότειναν μία αβέβαιη κρίσιμη συγκέντρωση των ορίων ευαισθησίας για την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της λινεζολίδης (MIC) <4 $\mu\text{g/mL}$. Αποτελέσματα από άλλες μελέτες υποστηρίζουν διαφορετικά όρια ελάχιστης

ανασταλτικής συγκέντρωσης για διαφορετικούς οργανισμούς: MIC<4 µg/ml για στελέχη *Enterococcus* και *Staphylococcus* και MIC<2 µg/ml για στελέχη *Streptococcus*.

Η λινεζολίδη έχει ελεγχθεί *in vitro* έναντι ενός ευρέως φάσματος βακτηρίων. Δρα κατά κύριο λόγο έναντι gram(+) μικροβίων και έχει καλύτερη δραστικότητα από την βανκομυκίνη έναντι αυτών, συμπεριλαμβανομένων και των στελεχών του εντερόκοκκου (ανθεκτικός στην βανκομυκίνη) και του *Staphylococcus aureus* (ενδιάμεσα ευαίσθητος στην βανκομυκίνη) [11].

Ενώ τα περισσότερα από τα ευρέως γνωστά αντιβιοτικά (μακρολίδες, γλωραμφαινικόλη) αναστέλλουν τις βακτηριακές πρωτεΐνες στο στάδιο της επιμήκυνσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η λινεζολίδη μπορεί να επέμβει και πιο νωρίς, αλληλεπιδρώντας ισχυρά με την επικράτεια V του 23S rRNA της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας. Στο στάδιο της εκκίνησης της βακτηριακής μετάφρασης, η 50S υπομονάδα συνδέεται με το fMet-tRNA και ένα σύμπλοκο έναρξης που αποτελείται από την 30S ριβοσωματική υπομονάδα και το mRNA, σχηματίζοντας έτσι το ενεργό ριβόσωμα 70S. 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 [12]. Αυτή η αλληλεπίδραση παρεμποδίζει την δέσμευση του επόμενου αμινοακυλο-tRNA στη θέση A της 50S υπομονάδας, με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της μεταγραφής. Εάν στη θέση P της 50S υπομονάδας βρίσκεται το tRNA της φορμυλομεθειονίνης, το tRNA του 2^{ου} αμινοξέος αδυνατεί να εισέλθει πλήρως στη θέση A, επειδή το σημείο φράσσεται από τη λινεζολίδη και έτσι το τελευταίο tRNA απομακρύνεται από το ριβόσωμα. Συνεπώς, η πρωτεϊνοσύνθεση δεν μπορεί να αρχίσει.

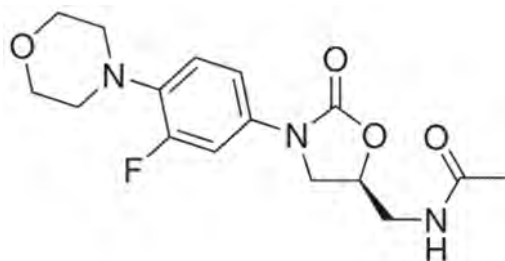
Η αντιμικροβιακή δράση της λινεζολίδης οφείλεται στην υδροξυακετυλική ομάδα που είναι προσαρτημένη στο ετεροκυκλικό άζωτο, ενώ η αυξημένη δραστικότητά της οφείλεται στην ύπαρξη του φθορίου ως υποκαταστάτη στην 3 φαινυλική θέση, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. [13]



Εικόνα 4. Στάδια A έως D: Φυσιολογική μετάφραση. Στάδια E έως H: Μετάφραση παρουσία λινεζολίδης. Η λινεζολίδα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, τα διάφορα αμινοακυλο-tRNA με γαλάζιο και πράσινο χρώμα, ενώ η μικρή και μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος με κίτρινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα [14].



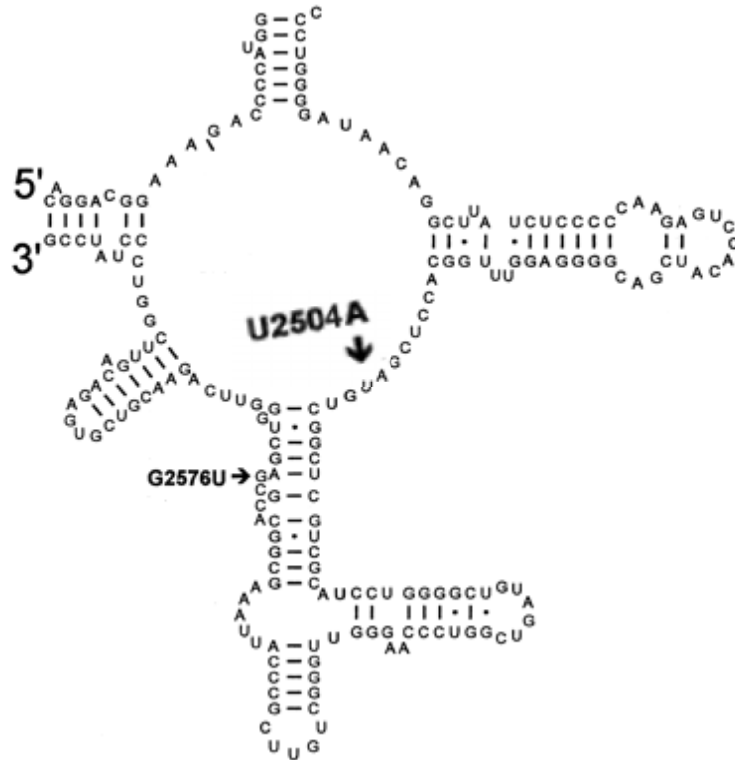
Εικόνα 5. Η τριδιάστατη δομή της λινεζολίδης [13].



Εικόνα 6. Η χημική δομή της λινεζολίδης [13].

1.3.3 Μεταλλαγμένα στελέχη

Οι οξαζολιδιόνες αναστέλλουν ως γνωστόν την πρωτεϊνική σύνθεση στα βακτήρια *in vivo*. Αρκετές υποθέσεις έχουν ληφθεί υπόψη όσον αφορά τον τρόπο δράσης των οξαζολιδιονών, παρ' όλ' αυτά καμία υπόθεση δεν μπορεί να θεωρηθεί πλήρης. Εντούτοις, η ανακάλυψη των μεταλλάξεων U2504A, C2534U και G2576U στο 23S rRNA των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* (βάση της αρίθμησης στο *E.coli*) έχει βοηθήσει στην κατανόηση της αντίστασής τους στις οξαζολιδιόνες και τονίζει την σημασία του ριβοσωματικού RNA στην πρόσδεση και στην δράση της λινεζολίδης στο σύμπλοκο εκκίνησης της πρωτεϊνικής σύνθεσης και στην 50S ριβοσωματική υπομονάδα (ενεργό ριβόσωμα 70S) [8]. Ο συνηθέστερος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα στην λινεζολίδα 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 του συμπλόκου της λινεζολίδης με τις μεταλλαγμένες 50S ριβοσωματικές υπομονάδες, σε σχέση με αυτή του συμπλόκου της λινεζολίδης με τις αγρίου τύπου 50S ριβοσωματικές υπομονάδες, προκειμένου να διαπιστωθεί ενδεχόμενη σχέση της παραπάνω υπόθεσης με την ανθεκτικότητα του *Staphylococcus 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). Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μελετηθούν οι δύο από τις τρεις προαναφερθείσες μεταλλάξεις (U2504A, G2576U).



Εικόνα 7. Η επικράτεια V του ριβοσωματικού RNA του E. Coli. Με βέλη σημειώνονται οι μεταλλάξεις U2504A και G2576U στο 23S rRNA [16].

1.4 Μοριακή Δυναμική

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής είναι σημαντικά εργαλεία για την κατανόηση των βασικών αρχών της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας των βιολογικών μακρομορίων. Με μία πρώτη ματιά οι πρωτεΐνες μοιάζουν με άκαμπτες κατασκευές, άποψη που όμως αντικαταστάθηκε με ένα μοντέλο δυναμικής στο οποίο οι εσωτερικές αλληλεπιδράσεις και αλλαγές στη φυσιολογική δομή της πρωτεΐνης φέρνουν αλλαγές και στην λειτουργία της.

Έχουν περάσει σχεδόν 35 χρόνια από τότε που η πρώτη προσομοίωση μοριακής δυναμικής ενός βιολογικού μακρομορίου ήρθε στη δημοσιότητα. Η προσομοίωση αφορούσε τον βόειο παγκρεατικό αναστολέα της θρυψίνης, έναν αναστολέα με υψηλή σταθερότητα και μικρό μέγεθος.

Με την βοήθεια της μοριακής δυναμικής μπορεί να πραγματοποιηθεί μια προσομοίωση των μεταβολών των ιδιοτήτων (θέσεις ατόμων, ταχύτητες, κτλ.) ενός μοριακού συστήματος σε συνάρτηση με τον χρόνο. Οι προσομοιώσεις μοριακής

δυναμικής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να δοθούν απαντήσεις σε ερωτήματα σχετικά με τις ιδιότητες του υπό μελέτη συστήματος, πολλές φορές με μεγαλύτερη ευκολία από ότι μέσω των πειραμάτων σε συστήματα *in vitro* [17].

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής έγιναν δυνατές χάρη στην ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Ουσιαστικά, όλη η εργασία γίνεται σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Ανάλογα, με τον αριθμό των ατόμων του υπό μελέτη συστήματος καθώς και τη διαθέσιμη υπολογιστική ισχύ οι προσομοιώσεις μπορούν να διαρκέσουν από ένα μικρό χρονικό διάστημα (μερικές εκατοντάδες ή χιλιάδες βήματα) μέχρι και ένα αρκετά μεγαλύτερο (μερικά εκατομμύρια βήματα). Οι προσομοιώσεις που εκτελούνται στον υπολογιστή, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ μικροσκοπικών μεγεθών και χρονικών κλιμάκων και του μακροσκοπικού κόσμου του εργαστηρίου. Επίσης, λειτουργούν ως γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος [18].

Η Μοριακή Δυναμική σχετίζεται με διαδικασίες που εξαρτώνται από τον χρόνο και που λαμβάνουν χώρα σε μοριακά συστήματα. Κάθε δυναμική διεργασία (π.χ. κίνηση) έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος 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 που γίνονται στην κλίμακα ολόκληρου του μορίου, όπως μία αναδίπλωση (μs - ms). Αρκετές από αυτές τις κινήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημική λειτουργία της πρωτεΐνης [19].

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 συναρτήσεως της θέσης (συναρτήσεις δυναμικού ή *force fields*), όπως είναι το AMBER και το CHARMM. Στις προσομοιώσεις της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση δυναμικού CHARMM, όπως θα δούμε αναλυτικά παρακάτω. Μια μαθηματική συνάρτηση δυναμικού, περιλαμβάνει εξισώσεις που περιγράφουν την μεταβολή της δυναμικής ενέργειας που οφείλεται: α) σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που δεν συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό και β) σε αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό. Οι εξισώσεις αυτές περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals, τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις καθώς και τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις [20].

α) Η εξίσωση που αφορά στην δυναμική ενέργεια λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Walls:

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

Το δυναμικό αυτό 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 [20].

β) Η εξίσωση που αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες διέπονται από τον νόμο του Coulomb:

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

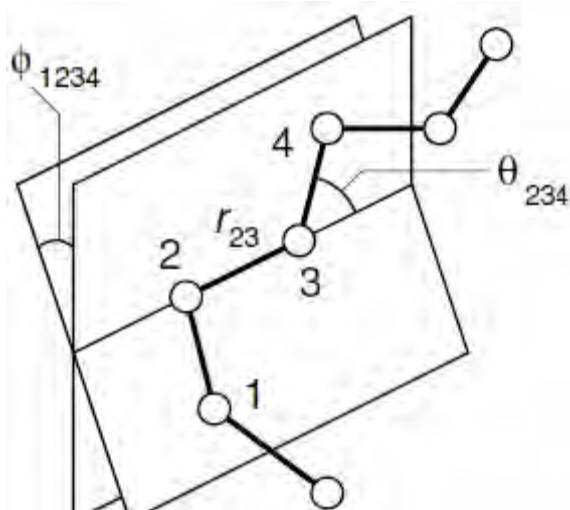
Τα Q_1 και Q_2 είναι τα φορτία δύο ατόμων, το r είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων, ενώ το ϵ_0 είναι η διηλεκτρική σταθερά του κενού. Το π είναι περίπου ίσο με 3,14 [20].

γ) Η εξίσωση η οποία αφορά στην δυναμική ενέργεια που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις ατόμων που συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό:

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

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 και ο τρίτος στην δυναμική ενέργεια λόγω στρέψεων [20].

Οι τρεις παραπάνω όροι μπορεί να γίνουν περαιτέρω κατανοητοί εάν αναπαραστήσουμε τις γωνίες που σχηματίζονται σε ένα απλουστευμένο σύστημα 7 ατόμων που διαδοχικά συνδέονται το ένα με το άλλο. Η εικόνα 8 αναπαριστά το παραπάνω απλουστευμένο σύστημα [20].



Εικόνα 8. Η απόσταση r_{23} συμβολίζει την απόσταση μεταξύ των ατόμων 2 και 3, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό. Η γωνία θ_{234} συμβολίζει την γωνία που σχηματίζουν δύο διαδοχικοί χημικοί δεσμοί. Τέλος, η γωνία ϕ_{1234} συμβολίζει την γωνία στρέψης [20].

Συνοψίζοντας λοιπόν, ένα πρόγραμμα προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής 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. Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσομοίωση της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος, τόσο στον αγρίου τύπου *Staphylococcus epidermidis*, όσο και στα 2 μεταλλαγμένα είδη του ίδιου οργανισμού, για 1.000.000 βήματα.

1.4.1 Διαδικασία μιας προσομοίωσης

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για την πραγματοποίησή τους απαιτούν τα εξής παρακάτω βήματα:

1) *Προετοιμασία του συστήματος:* Κατεβάζουμε ένα αρχείο συντεταγμένων pdb του υπό μελέτη συστήματος από την protein data bank. Το τεμαχίζουμε στα επιμέρους μοριακά είδη που το αποτελούν (στην δική μας περίπτωση σε 34) και στη συνέχεια με τη βοήθεια του προγράμματος psfgen το ανασυντάσσουμε

δημιουργώντας ένα νέο αρχείο pdb μαζί με τα υδρογόνα καθώς και ένα αρχείο τοπολογίας psf.

2) *Διαλυτοποίηση*: Προσθήκη μορίων νερού στο σύστημα για να διαλυτοποιηθεί. Στη δική μας περίπτωση προσθέσαμε, για λόγους που θα εξηγηθούν παρακάτω, ένα στρώμα νερού μόλις 3 Å [19].

3) *Προσθήκη ιόντων*: Μετά την διαλυτοποίηση του συστήματος πρέπει να προστεθούν σε αυτό ιόντα, έτσι ώστε το σύστημα να καταστεί ηλεκτρικά ουδέτερο [21].

4) *Ελαχιστοποίηση ενέργειας*: Πριν από την έναρξη 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.

5) *Εξισορρόπηση*: Ο σκοπός αυτής της φάσης είναι να σταθεροποιηθούν αναφορικά με τον χρόνο, διάφορες ιδιότητες του συστήματος (ανάλογα με το στατιστικό σύνολο που επιλέγουμε) όπως η ενέργεια, η θερμοκρασία, και η πίεση [19].

6) *Υπολογισμός του RMSD*: Το RMSD (Root Mean Square Deviation) είναι ένας δείκτης που φανερώνει τη δομική διαφορά μεταξύ δύο καταστάσεων του ίδιου μορίου. Εδώ χρησιμοποιείται για ποσοτικοποίηση της μεταβολής στη δομή του μορίου που εξισορροπείται σε σχέση με την αρχική του κατάσταση. Το RMSD δίνεται από τη σχέση:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_i m_i \|r_{i,1} - r_{i,2}\|^2}$$

Το $r_{i,1}$ είναι το διάνυσμα θέσης του ατόμου i στο βήμα 1, ενώ το $r_{i,2}$ είναι το διάνυσμα θέσης του ατόμου i στο βήμα 2. M είναι το πλήθος των ατόμων του συστήματος.

Μέσω ενός γραφήματος διασποράς στο πρόγραμμα Microsoft Office Excel 2003 μπορούμε να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του δείκτη RMSD ως συνάρτηση του χρόνου. Όταν αρχίζει να σταθεροποιείται η καμπύλη μεταβολής του, γύρω από μία τιμή, φθάνοντας σε ένα plateau, θεωρούμε ότι η εξισορρόπηση έχει τελειώσει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: Πειραματικό Μέρος

2.1 Στέλεχος αγρίου τύπου με προσθήκη λινεζολίδης

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής κατατάσσονται στις θεωρητικές ή υπολογιστικές μεθόδους.

Επειδή η Protein Data Bank δεν διαθέτει το αρχείο συντεταγμένων pdb για την 50S ριβοσωματική υπομονάδα του οργανισμού *Staphylococcus epidermidis*, με τον οποίο και ασχοληθήκαμε, προμηθευτήκαμε το αρχείο συντεταγμένων pdb της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας του συγγενικού οργανισμού *Escherichia Coli*. Σε αυτό το αρχείο pdb ενσωματώσαμε τις συντεταγμένες της λινεζολίδης, της οποίας η τριδιάστατη δομή είναι γνωστή από την ενσωματωμένη της διαμόρφωση στην 50S ριβοσωματική υπομονάδα του *Haloarcula Marismortui* (3CPW.pdb). Πραγματοποιήθηκαν ομοπαράθεσεις (τμήμα των ομοπαράθεσεων παρατίθεται στο παράρτημα) των νουκλεοτιδίων του 23S rRNA του *Staphylococcus epidermidis*, τόσο με τα νουκλεοτίδια του 23S rRNA της *Escherichia Coli*, όσο και με τα νουκλεοτίδια του 23S rRNA άλλων οργανισμών όπως του *Haloarcula Marismortui*, του *Deinococcus Radiodurance* και του *Thermus Thermophilus*. Το 23S rRNA του *Staphylococcus epidermidis* ταυτίστηκε με αυτό της *Escherichia Coli* σε ποσοστό 71,6%, με αυτό του *Haloarcula Marismortui* σε ποσοστό 58,2%, με αυτό του *Deinococcus Radiodurance* σε ποσοστό 72,7% και με αυτό του *Thermus Thermophilus* σε ποσοστό 72%. Οι ομοπαράθεσεις έγιναν με το πρόγραμμα Laling [24].

Πραγματοποιήθηκαν 3 προσομοιώσεις της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας της *Escherichia Coli* μετά την ενσωμάτωση της λινεζολίδης. Η πρώτη προσομοίωση περιλάμβανε την αγρίου τύπου 50S ριβοσωματική υπομονάδα, η δεύτερη την 50S ριβοσωματική υπομονάδα με την μετάλλαξη U2504A και η τρίτη προσομοίωση την 50S ριβοσωματική υπομονάδα με την μετάλλαξη G2576U. Για να ενσωματωθούν οι δύο παραπάνω μεταλλάξεις στην αγρίου τύπου 50S ριβοσωματική υπομονάδα και να προκύψουν άλλες δύο σειρές προσομοιώσεων, θα πρέπει να γίνουν τα εξής: Πρώτον, να βρούμε σε ποιο από τα 34 τεμαχισμένα αρχεία pdb περιέχονται τα νουκλεοτίδια U2504 και G2576. Δεύτερον, να τροποποιήσουμε την αντίστοιχη αλυσίδα στο αρχείο κειμένου «psf_50S_mut2576U_no_B2096-2188_H_ZLD.txt» με την εντολή «mutate

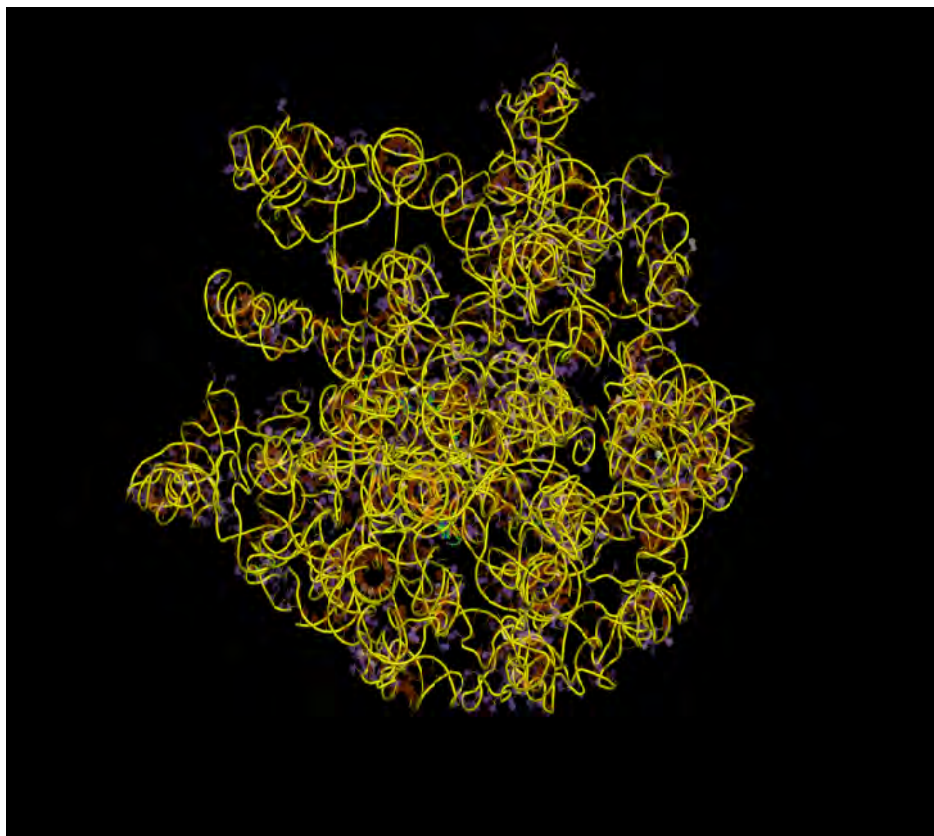
2576 URA» αν πρόκειται για τη μετάλλαξη γουανίνης σε ουρακίλη. Εάν πρόκειται για τη μετάλλαξη ουρακίλης σε αδενίνη, θα πρέπει αντίστοιχα να τροποποιήσουμε την αλυσίδα που περιέχει την ουρακίλη στο αρχείο κειμένου «psf_50S_mut2504A_no_B2096-2188_H_ZLD.txt» με την εντολή «mutate 2504 ADE».

Σκοπός των προσομοιώσεων είναι 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 μας επιτρέψει να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα για την ευστάθεια του συμπλόκου 50S-λινεζολίδης τόσο στην αγρίου τύπου μορφή όσο και στις δύο μεταλλαγμένες. Η δομή της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας του οργανισμού *Escherichia coli* αποκτήθηκε από την ιστοσελίδα <http://rcsb.org/pdb/home/home.do> (Protein Data Bank) με κωδικό 2AW4.pdb.

Οι προσομοιώσεις της αγρίου τύπου 50S ριβοσωματικής υπομονάδας και των δύο μεταλλαγμένων υπομονάδων πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του προγράμματος NAMD σε λειτουργικό σύστημα Linux Scientific Edition [22]. Η προετοιμασία των υπό προσομοίωση αρχείων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος VMD σε λειτουργικό σύστημα Windows XP [18]. Η διαδικασία απόδοσης των αποτελεσμάτων (διαγράμματα RMSD) έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel 2003. Οι προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι ίδιες και για τα τρία στελέχη, οπότε θα περιγράψουμε την προσομοίωση για το αγρίου τύπου στέλεχος και θα επισημάνουμε τις διαφορές σε σχέση με τις προσομοιώσεις των δύο μεταλλαγμένων στελεχών.

2.1.1 Τεμαχισμός /Προετοιμασία του συστήματος

Τεμαχίζουμε το αρχείο συντεταγμένων 2AW4.pdb σε 34 μικρότερα κομμάτια. Στη συνέχεια μέσω του προγράμματος psfgen το ανακατασκευάζουμε δημιουργώντας ένα νέο αρχείο pdb με τα υδρογόνα καθώς και ένα αρχείο τοπολογίας psf.



Εικόνα 9. 3D-απεικόνιση του 23S rRNA και του 5S rRNA στην 50S ριβοσωματική υπομονάδα [23].

2.1.2 Δημιουργία του αρχείου psf και pdb με τα υδρογόνα

Επειδή ένα αρχείο συντεταγμένων pdb δεν περιέχει καμία πληροφορία για τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων, πρέπει να δημιουργηθεί ένα αρχείο τοπολογίας psf, το οποίο και περιέχει αυτή την πληροφορία σαν απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της προσομοίωσης [21]. Το αρχείο αυτό το δημιουργούμε με τη βοήθεια του προγράμματος psfgen με βάση το αρχικό αρχείο pdb και ένα αρχείο τοπολογίας, το οποίο στην δική μας προσομοίωση είναι το τροποποιημένο με την τοπολογία της λινεζολίδης αρχείο `top_all27_prot_na_ZLD.inp` [25].

Πλέον μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα νέο αρχείο pdb και ένα νέο αρχείο psf (`50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.pdb`, `50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.psf` αντίστοιχα). Τα δύο αυτά αρχεία, μαζί με τις συντεταγμένες των ατόμων του υδρογόνου, δημιουργήθηκαν με αντιγραφή του tcl script (σύνολο εκτελέσιμων εντολών) και επικόλληση στην κονσόλα του psfgen. Το tcl script είναι ένα αρχείο κειμένου με όνομα `psf_50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.txt`. Το συγκεκριμένο αρχείου κειμένου παρατίθεται στο παράρτημα.

2.1.3 Ενυδάτωση μορίου

Η διαλυτοποίηση σε μία σφαίρα νερού πραγματοποιείται έτσι ώστε να μπορέσουμε να προσεγγίσουμε το πραγματικό κυτταρικό περιβάλλον του ριβοσώματος στον ηλεκτρονικό υπολογιστή [21]. Οι πρωτεΐνες είτε δρουν μέσα στο κύτταρο είτε έξω από αυτό βρίσκονται σε υδατικό περιβάλλον. Συνεπώς και η δομή τους αλλά και οι λειτουργίες που επιτελούν προσαρμόζονται με βάση της αλληλεπιδράσεις που έχουν οι ίδιες με το νερό. Στην παρούσα διπλωματική εργασία λόγω του μεγάλου μεγέθους της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας, η προσθήκη των μορίων νερού στο σύστημα το καθιστά πολύ «βαρύ» σε σχέση με την υπάρχουσα υπολογιστική ισχύ. Για αυτό και την αρχική ποσότητα του νερού που είχαμε προσθέσει, την ελαττώσαμε σημαντικά σε ένα στρώμα νερού 3 Å γύρω από την 50S ριβοσωματική υπομονάδα. Η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενός tcl script με το όνομα solvate_50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.txt το οποίο και παρατίθεται στο παράρτημα. Στην κονσόλα του VMD πληκτρολογούμε:

```
cd "διεύθυνση του φακέλου εργασίας μας"  
play solvate_50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.txt
```

Το αποτέλεσμα της παραπάνω εντολής είναι η δημιουργία δύο νέων αρχείων στο φάκελο εργασίας μας με όνομα 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.pdb και 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.psf. Επίσης, μέσω της παραπάνω εντολής μας δίνονται τόσο οι συντεταγμένες του κέντρου μάζας του νέου ενυδατωμένου μορίου όσο και η ακτίνα του, στοιχεία που θα χρησιμοποιήσουμε και στην διαδικασία της ελαχιστοποίησης ενέργειας και στην διαδικασία της εξισορρόπησης.

2.1.4 Προσθήκη ιόντων

Το επόμενο βήμα στην διαδικασία της προσομοίωσης της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας είναι η προσθήκη ιόντων στο σύστημα έτσι ώστε να καταστεί ηλεκτρικά ουδέτερο. Η προσθήκη ιόντων Na εξουδετερώνει τα αρνητικά φορτία, ενώ η προσθήκη ιόντων Cl εξουδετερώνει αντίστοιχα τα θετικά φορτία. Η διαδικασία

προσθήκης ιόντων δεν πραγματοποιήθηκε λόγω απουσίας της απαραίτητης ποσότητας μορίων νερού.

2.1.5 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας είναι το τελευταίο βήμα πριν την διαδικασία της εξισορρόπησης. Κατά την ελαχιστοποίηση, το πρόγραμμα που εκτελεί τις προσομοιώσεις, στην περίπτωσή μας το NAMD2, προσπαθεί να βρει ένα τοπικό ελάχιστο της ενέργειας του υπό μελέτη συστήματος, από το οποίο μετά θα ξεκινήσει η εξισορρόπησης του.

Τα αρχεία που απαιτούνται από το NAMD2 για την διαδικασία της ελαχιστοποίησης είναι τα εξής: 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.pdb, 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.psf, par_all27_prot_na_LNZ_trop_2.inp. Το τελευταίο είναι ένα αρχείο παραμέτρων, τροποποιημένο με τις παραμέτρους της λινεζολίδης. Στο αρχείο κειμένου min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt ορίσαμε σαν «outputname» το όνομα min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD, κάτι που συνεπάγεται ότι όλα τα αρχεία που θα δημιουργούνται θα έχουν αυτό το όνομα. Επίσης, εισήγαμε σε αυτό τις συντεταγμένες του κέντρου μάζας του ενυδατωμένου μορίου και την ακτίνα του. Η διαδικασία της ελαχιστοποίησης πραγματοποιήθηκε για 4.000 βήματα σε λειτουργικό σύστημα Linux Scientific Edition. Κάνοντας δεξί κλικ στον φάκελο εργασία μας, επιλέξαμε την εντολή «open in terminal». Ακολούθως πληκτρολογήσαμε στην κονσόλα του τερματικού την παρακάτω εντολή:

```
./charmrun ++local namd2 +p2 min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt >  
log_min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt
```

Στο τέλος της ελαχιστοποίησης προκύπτουν 3 νέα αρχεία με όνομα min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.coor, min_50S_wt_no_B2096_2188_H_ws_ZLD.vel, min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.xsc. Το αρχείο κειμένου log_min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt δημιουργείται αυτόματα κατά τη διαδικασία της ελαχιστοποίησης. Πρόκειται για ένα αρχείο που καθ' όλη την διάρκεια της προσομοίωσης μας ενημερώνει για τα βήματα τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί, για τις τιμές των ενεργειών του συστήματος, καθώς και για το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να τελειώσει η διαδικασία. Το αρχείο min_50S_wt_no_B2096-

2188_H_ws_ZLD.coor περιέχει τις συντεταγμένες όλων των ατόμων του συστήματος με ελαχιστοποιημένη ενέργεια και χρησιμοποιείται στο στάδιο της εξισορρόπησης. Το αρχείο κείμενου min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt παρατίθεται στο παράρτημα.

2.1.6 Εξισορρόπηση

Η διαδικασία της εξισορρόπησης που εκτελείται από το πρόγραμμα NAMD2, εντάσσεται στην ίδια φιλοσοφία με αυτήν της ελαχιστοποίησης ενέργειας. Σκοπός της εξισορρόπησης είναι να σταθεροποιηθούν αναφορικά με τον χρόνο, διάφορες ιδιότητες του συστήματος όπως η ενέργεια, η πίεση και η θερμοκρασία. Όπως και στην ελαχιστοποίηση, έτσι και στην εξισορρόπηση χρειάζεται ένα αρχείο κειμένου στο οποίο ορίζονται οι παράμετροι της προσομοίωσης, οι συνθήκες της προσομοίωσης καθώς και τα αρχεία που θα χρησιμοποιηθούν. Η διαδικασία της εξισορρόπησης πραγματοποιήθηκε για 1.000.000 βήματα σε θερμοκρασία 300 K, μέσω 5 διαδοχικών προσομοιώσεων. Τα αρχεία που χρησιμοποιούνται από το πρόγραμμα NAMD2 για την διαδικασία της εξισορρόπησης είναι τα εξής: min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.coor, 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.psf, par_all27_prot_na_LNZ_trop_2.inp. Στο αρχείο κειμένου (eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt) ορίσαμε ότι όλα τα αρχεία που θα προκύψουν από την διαδικασία της εξισορρόπησης (outputname) θα έχουν το όνομα eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD. Η διαδικασία της εξισορρόπησης πραγματοποιήθηκε στο λειτουργικό σύστημα Linux Scientific Edition. Κάνοντας δεξί κλικ στον φάκελο εργασία μας, επιλέξαμε την εντολή «open in terminal» Η εντολή που δόθηκε στην κονσόλα του τερματικού για την έναρξη της διαδικασίας είναι η παρακάτω:

```
./charmrun ++local namd2 +p2 eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt > log_eq_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt
```

Το αρχείο κειμένου log_eq_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt μας παρουσιάζει την εξέλιξη της εξισορρόπησης ανά 100 βήματα. Τόσο ένα απόσπασμα ενός τέτοιου αρχείου κειμένου, όσο και το αρχείου κειμένου eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt παρατίθενται στο παράρτημα. Πριν την έναρξη της εξισορρόπησης πραγματοποιείται μία μικρή ελαχιστοποίηση των 100 βημάτων,

γεγονός το οποίο και ρυθμίζεται στο αρχείο κειμένου eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt. Με το τέλος της εξισορρόπησης προκύπτουν 10 νέα αρχεία που όπως είπαμε θα έχουν και το ίδιο όνομα. Αυτά είναι τα εξής:

- 1) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.coor
- 2) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.vel
- 3) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.xsc
- 4) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.dcd
- 5) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.restart.xsc
- 6) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.restart.xsc.old
- 7) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.restart.vel
- 8) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.restart.vel.old
- 9) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.restart.coor
- 10) eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.restart.coor.old

Πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι τόσο κατά την διάρκεια της ελαχιστοποίησης, όσο και κατά την διάρκεια της εξισορρόπησης διατηρήσαμε τις θέσεις 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, αλλάζοντας τον αριθμό 0 της προτελευταίας στήλης των εν λόγω ατόμων σε 1 και δημιουργώντας ένα νέο αρχείο με κατάληξη ref.

2.1.7 Τελική ελαχιστοποίηση

Πριν από τους υπολογισμούς των ενεργειών αλληλεπίδρασης λινεζολίδης/50S ριβοσωματικής υπομονάδας πραγματοποιήσαμε μία τελική ελαχιστοποίηση των εξισορροπημένων δομών για 500 βήματα. Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήσαμε ένα αρχείο κειμένου παρόμοιο με αυτό της ελαχιστοποίησης ενέργειας, στο οποίο ορίσαμε ότι θα χρησιμοποιηθεί το αρχείο eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.coor που προέκυψε από την εξισορρόπηση. Οι υπόλοιπες παράμετροι έχουν παραμείνει ίδιες.

2.1.8 Υπολογισμός του RMSD

Μέσω ενός γραφήματος διασποράς στο πρόγραμμα Microsoft Office Excel 2003 μπορούμε να αναπαραστήσουμε την μεταβολή του δείκτη RMSD σε συνάρτηση με τον χρόνο. Στο αρχείο κειμένου το οποίο χρησιμοποιήσαμε ορίστηκε ότι θα

καταγράφονται στιγμιότυπα για κάθε 500 βήματα της εξισορρόπησης (1 ps). Άρα σε μία προσομοίωση του 1.000.000 βημάτων θα έχουμε συνολικά 2.000 στιγμιότυπα. Όταν αρχίζει να σταθεροποιείται η καμπύλη μεταβολής του RMSD γύρω από μία τιμή, φθάνοντας σε ένα plateau, θεωρούμε ότι η εξισορρόπηση έχει τελειώσει. Για τον υπολογισμό του δείκτη RMSD θα χρησιμοποιήσουμε το αρχείο κειμένου rmsd_dcd.txt (παρατίθεται στο παράρτημα). Με την βοήθεια αυτού του αρχείου δημιουργούμε ένα αρχείο κειμένου, το οποίο περιέχει σε μία λίστα όλες τις τιμές του RMSD που αντιστοιχούν σε κάθε στιγμιότυπο. Σε πρώτη φάση φορτώσαμε στο VMD το αρχείο min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.coor ως εξής: VMD main > File >New molecule στο παράθυρο Molecular File Browser. Στο VMD main επιλέξαμε Load Data Into Molecule και φορτώσαμε το αρχείο eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.dcd. Στην κονσόλα του VMD πληκτρολογήσαμε:

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

Τα διαγράμματα με τις μεταβολές του RMSD, τόσο για την αγρίου τύπου 50S ριβοσωματική υπομονάδα, όσο και για τις δυο μεταλλαγμένες, παρουσιάζονται παρακάτω στην ενότητα «Αποτελέσματα».

2.2 50S υπομονάδα μεταλλαγμένου στελέχους (U2504A) με προσθήκη λινεζολίδης

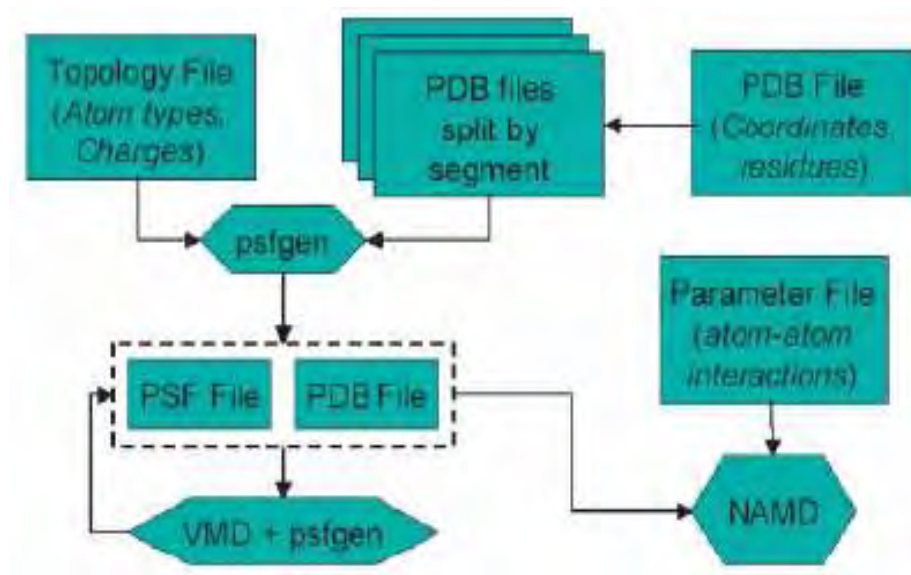
Έγινε σημειακή μεταλλαγή στην νουκλεοτιδική βάση υπ' αριθμόν 2504 και η ουρακίλη (U) αντικαταστάθηκε με αδερίνη (A). Ακολουθήθηκε ακριβώς παρόμοια διαδικασία με την 50S αγρίου τύπου ριβοσωματική υπομονάδα και το σύνολο βημάτων της προσομοίωσης είναι το ίδιο (1.000.000 βήματα). Η μοναδική διαφορά ήταν η τροποποίηση του ονόματος των αρχείων. Το όνομα ήταν το εξής: 50s_mut-U2504A_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.είδος αρχείου. Η εξισορρόπηση των 1.000.000 βημάτων πραγματοποιήθηκε μέσω 3 διαδοχικών προσομοιώσεων σε θερμοκρασία 300 K.

2.3 50S υπομονάδα μεταλλαγμένου στελέχους (G2576U) με προσθήκη λινεζολίδης

Έγινε σημειακή μεταλλαγή στην νουκλεοτιδική βάση υπ' αριθμόν 2576 και η γουανίνη (G) αντικαταστάθηκε με ουρακίλη (U). Ακολουθήθηκε ακριβώς παρόμοια διαδικασία με την 50S αγρίου τύπου ριβοσωματική υπομονάδα και το σύνολο βημάτων της προσομοίωσης είναι το ίδιο (1.000.000 βήματα). Η μοναδική διαφορά ήταν η τροποποίηση του ονόματος των αρχείων. Το όνομα ήταν το εξής: 50s_mut-G2576U_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.είδος αρχείου. Η εξισορρόπηση των 1.000.000 βημάτων πραγματοποιήθηκε μέσω 5 διαδοχικών προσομοιώσεων σε θερμοκρασία 300 K.

2.4 Συμπέρασμα

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 διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το τροποποιημένο αρχείο παραμέτρων par_all27_prot_na_LNZ_trop_2.inp για πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, το οποίο περιλαμβάνει και τις παραμέτρους για την λινεζολίδα. Όλα αυτά φαίνονται και στο διάγραμμα της παρακάτω εικόνας.



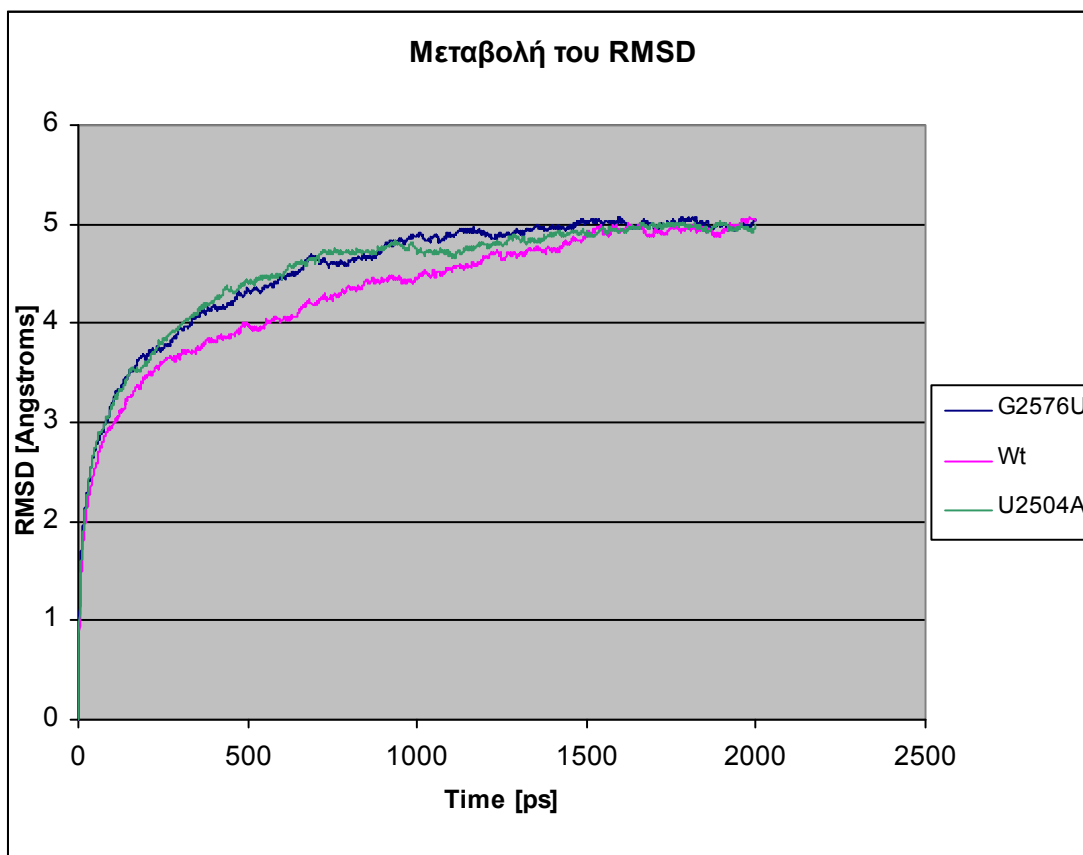
Εικόνα 10. Τρόπος χρήσης των διαφόρων αρχείων από τα προγράμματα VMD και NAMD [21].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Αποτελέσματα/Σχολιασμός αποτελεσμάτων

3.1 Τιμές RMSD

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η πορεία μεταβολής της δομής της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας στην αγρίου τύπου μορφή της καθώς και στις δύο μεταλλαγμένες της μορφές (μεταλλάξεις U2504A, G2576U). Οι προσομοιώσεις και των τριών παραπάνω υπομονάδων πραγματοποιήθηκαν για 1.000.000 βήματα, δηλαδή 2.000 στιγμιότυπα. Το κάθε στιγμιότυπο (1 ps) αντιστοιχεί σε 500 βήματα εξισορρόπησης. Ο σχεδιασμός του παρακάτω διαγράμματος έγινε στο πρόγραμμα Microsoft Office Excel 2003, μέσω επικόλλησης σε αυτό των τιμών του RMSD που προέκυψαν από τις 3 εξισορροπήσεις. Πρόκειται για ένα γράφημα διασποράς που στον οριζόντιο άξονα έχει τους αριθμούς από το 0 έως το 2.000, αριθμοί που αντιπροσωπεύουν το κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης, ενώ στον κατακόρυφο άξονα έχει τις τιμές του RMSD για τις τρεις προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Στο διάγραμμα μεταβολής του RMSD βλέπουμε ότι κατά τα πρώτα στάδια της εξισορρόπησης παρατηρείται μία απότομη αύξηση των τιμών του RMSD και στις τρεις περιπτώσεις. Αυτό οφείλεται στην γρήγορη μεταβολή της δομής των τριών υπομονάδων κατά την διάρκεια των πρώτων περίπου 5.000 βημάτων. Όσο περνάει ο χρόνος της προσομοίωσης, αυτή η μεταβολή γίνεται όλο και μικρότερη. Στις δύο μεταλλαγμένες υπομονάδες η μεταβολή του RMSD ακολουθεί μια πορεία διαφορετική από αυτή της wild type υπομονάδας. Για παράδειγμα, στα 500 ps ο δείκτης RMSD για την wild type υπομονάδα είναι 3,99 Å, ενώ για τις μεταλλαγμένες υπομονάδες είναι 4,39 Å (G2576U) και 4,41 Å (U2504A). Στα 1.000 ps ο δείκτης RMSD είναι 4,44 Å για την wild type υπομονάδα, 4,89 Å για την μεταλλαγμένη υπομονάδα με την μετάλλαξη G2576U και 4,72 Å για την μεταλλαγμένη υπομονάδα με την μετάλλαξη U2504A. Όσο περνάει ο χρόνος της προσομοίωσης, τόσο οι διαφορές των τιμών του RMSD γίνονται όλο και μικρότερες, φτάνοντας στα 2.000 ps, όπου ο δείκτης RMSD είναι 5,028 Å για την wild type υπομονάδα, 5,035 Å για την μεταλλαγμένη υπομονάδα με την μετάλλαξη G2576U και 4,987 Å για την μεταλλαγμένη υπομονάδα με την μετάλλαξη U2504A. Από τα 1480 ps και μετά



Εικόνα 11. Διάγραμμα μεταβολής του RMSD για την αγρίου τύπου(wt) 50S ριβοσωματική υπομονάδα (ροζ χρώμα) και για τις μεταλλαγμένες 50S ριβοσωματικές υπομονάδες (U2504A-πράσινο χρώμα,G2576U-μπλε χρώμα).

μπορούμε με επιφύλαξη να πούμε ότι ο δείκτης RMSD στις 2 μεταλλαγμένες υπομονάδες έχει αρχίσει να σταθεροποιείται. Τονίζεται ο όρος «επιφύλαξη», διότι με την διαθέσιμη υπολογιστική ισχύ δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω συνέχιση των προσομοιώσεων για την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων. Στην wild-type δομή παρατηρείται μια σταθεροποίηση του δείκτη RMSD από τα 1710 ps και μετά.

3.2 Ενεργειακές τιμές

Ο υπολογισμός των ενεργειών αλληλεπίδρασης λινεζολίδης/ 50S ριβοσωματικής υπομονάδας όπως αναφέρθηκε και παραπάνω απαιτεί μια τελική ελαχιστοποίηση των εξισορροπημένων δομών για 500 βήματα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναγράφονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Elec) των φορτίων της λινεζολίδης με τα υπόλοιπα φορτία του συστήματος, οι αλληλεπιδράσεις (VdW) των ατόμων της λινεζολίδης με τα υπόλοιπα άτομα του συστήματος, καθώς και το άθροισμα αυτών των δύο αλληλεπιδράσεων. Από το log file της τελικής ελαχιστοποίησης προκύπτει και η δυναμική ενέργεια του ολικού συστήματος,

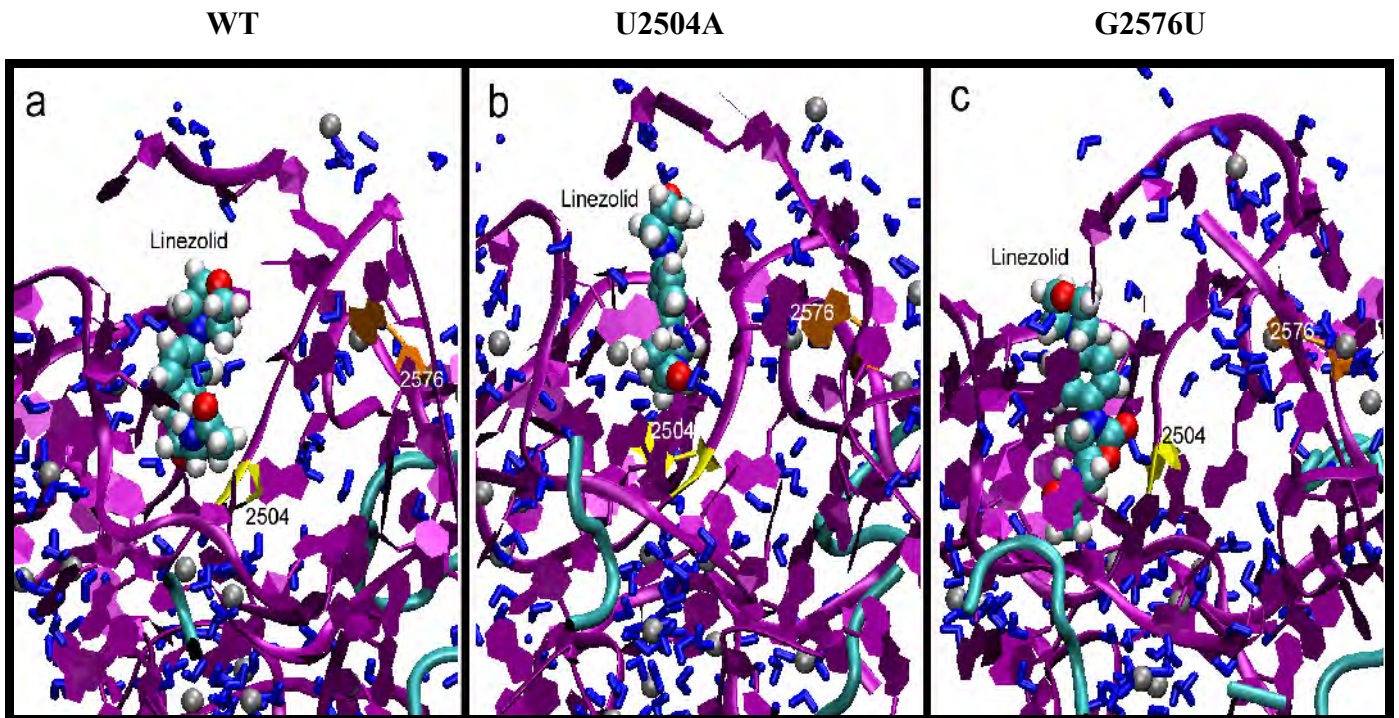
αφαιρώντας από την συνολική ενέργεια την κινητική ενέργεια. Ο υπολογισμός των ενεργειών έγινε τόσο για την wild type όσο και για τις μεταλλαγμένες υπομονάδες.

Πίνακας 1. Ενέργειες αλληλεπίδρασης 50S ριβοσωματικής υπομονάδας /λινεζολίδης και ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής (mic) για την αγρίου τύπου 50S καθώς και για τις φέρουσες τις μεταλλάξεις G2576U και U2504A.

	Elec (kcal/mol)	VdW (kcal/mol)	Elec+VdW (kcal/mol)	mic (μg/ml)
Wild type	-57,71	-43,95	-101,66	5
G2576U	-40,07	-48,39	-88,46	24
U2504A	-39,31	-47,2	-86,51	256

Από τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνουμε ότι η ενέργεια αλληλεπίδρασης της λινεζολίδης με την αγρίου τύπου 50S ριβοσωματική υπομονάδα είναι κατά απόλυτη τιμή μεγαλύτερη από την ενέργεια αλληλεπίδρασης της λινεζολίδης με τις μεταλλαγμένες 50S ριβοσωματικές υπομονάδες. Η ενέργεια αλληλεπίδρασης της λινεζολίδης με τις δύο μεταλλαγμένες υπομονάδες κυμαίνεται περίπου στα ίδια επίπεδα. Οι τιμές των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και στις τρεις περιπτώσεις εναρμονίζονται με αυτές του συνόλου των αλληλεπιδράσεων. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δείχνουν πως η λινεζολίδα εμφανίζεται να συνδέεται σταθερότερα με την Wild type υπομονάδα από ότι με τις δύο μεταλλαγμένες. Τα δεδομένα μας έρχονται σε συμφωνία με τις ανθεκτικότητες που έχουν παρατηρηθεί. Τόσο η μετάλλαξη U2504A, όσο και η μετάλλαξη G2576U φαίνεται να αποσταθεροποιούν το σύμπλοκο λινεζολίδης /50S ριβοσωματικής υπομονάδας, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Οι δυναμικές ενέργειες του ολικού συστήματος είναι παρεμφερείς και στα τρία συστήματα, υποδηλώνοντάς μας, ότι οι διαταραχές στο ολικό σύστημα παρουσία ή απουσία μεταλλάξεων είτε είναι πολύ μικρές, είτε ότι επέρχεται μερική αντιστάθμιση των δυσμενών, για την πρόσδεση, τοπικών αλλαγών με αναδιατάξεις σε άλλα σημεία του συμπλόκου.

3.3 Αλληλεπίδραση λινεζολίδης-23S rRNA στα 3 στελέχη που μελετήθηκαν



Εικόνα 12. Περιοχή της άμεσης γειτονιάς της λινεζολίδης(linezolid) για την αγρίου τύπου 50S ριβοσωματική υπομονάδα (a), για την μεταλλαγμένη 50S ριβοσωματική υπομονάδα με την μετάλλαξη U2504A (b) και για την μεταλλαγμένη 50S ριβοσωματική υπομονάδα με την μετάλλαξη G2576U (c). Διακρίνονται οι αλυσίδες των νουκλεϊκών οξέων με μωβ χρώμα, οι πρωτεϊνικές αλυσίδες με γαλάζιο χρώμα, τα μόρια νερού με μπλε χρώμα, τα ιόντα μαγνησίου με γκρίζο χρώμα, η αζωτούχος βάση με αριθμό 2504 (με βάση την αρίθμηση στην *E.coli*) είτε είναι ουρακίλη (a) και (c), είτε είναι αδερίνη (b) με κίτρινο χρώμα και η αζωτούχος βάση με αριθμό 2576 (με βάση την αρίθμηση στην *E.coli*) είτε είναι γουανίνη (a) και (b) είτε είναι ουρακίλη (c) με πορτοκαλί χρώμα. Η παραπάνω εικόνα δημιουργήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος VMD σε λειτουργικό σύστημα Windows XP [18].

Με βάση την εικόνα 12 η αλληλεπίδραση της αζωτούχου βάσεως 2504 με τον δακτύλιο A της λινεζολίδης επηρεάζει την πρόσδεση αυτής στην V περιοχή του 23S rRNA. Η μετάλλαξη U2504A μεταβάλλει την θέση της λινεζολίδης προς τα πάνω (εικόνα 12b) σε σχέση με την θέση της λινεζολίδης στο 23S rRNA αγρίου τύπου

(εικόνα 12a). Η σημαντική αναδιάταξη των ομάδων του θύλακα πρόσδεσης αντισταθμίζουν την παραπάνω διαταραχή με αποτέλεσμα την αύξηση (λιγότερο αρνητική) της ενέργειας αλληλεπίδρασης 50S ριβοσωματικής υπομονάδας/ λινεζολίδης (πίνακας 1). Όντως η ενέργεια αλληλεπίδρασης 50S ριβοσωματικής υπομονάδας/λινεζολίδης στην μετάλλαξη U2504A είναι λιγότερο αρνητική από την αντίστοιχη ενέργεια αλληλεπίδρασης στο στέλεχος αγρίου τύπου. Όσον αφορά στην μετάλλαξη G2576U, με βάση την εικόνα 12c, μπορούμε να πούμε ότι η θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης στην V περιοχή του 23S rRNA δεν έχει επηρεαστεί σημαντικά σε σχέση με την αντίστοιχη θέση πρόσδεσης στο στέλεχος αγρίου τύπου (εικόνα 12a). Οι ομάδες του θύλακα πρόσδεσης έχουν παραμείνει στην θέση τους και ο τρόπος σύνδεσης της λινεζολίδης στο 23S rRNA μοιάζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό με αυτόν του στελέχους αγρίου τύπου. Η αζωτούχος βάση 2576 βρίσκεται παραπλεύρως της θέσης πρόσδεσης της λινεζολίδης, χωρίς να αλληλεπιδρά άμεσα με αυτή. Παρ' όλ' αυτά, φαίνεται ότι η μετάλλαξή της από γουανίνη σε ουρακίλη προκαλεί δομικές αλλαγές στην περιοχή γύρω από την θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης με αποτέλεσμα την κατά απόλυτο τιμή μείωση της ενέργειας αλληλεπίδρασης 50S ριβοσωματικής υπομονάδας/λινεζολίδης στην μετάλλαξη G2576U από τα -101,66 kcal/mol(αγρίου τύπου στέλεχος) στα -88,46 kcal/mol. Είναι ξεκάθαρο ότι η λινεζολίδα συνδέεται πιο εξειδικευμένα στην περίπτωση της εικόνας 12c σε σχέση με την εικόνα 12b, κάτι το οποίο πιθανόν δεν αντικατοπτρίζεται στις 2 μονάδες διαφορά (kcal/mol) που έχουν οι ενέργειες αλληλεπίδρασης 50S ριβοσωματικής υπομονάδας /λινεζολίδης των δύο προαναφερθεισών μεταλλάξεων. Σε γενικές γραμμές, ο τρόπος σύνδεσης της λινεζολίδης στο 23S rRNA με την μετάλλαξη G2576U μοιάζει περισσότερο με αυτόν του στελέχους αγρίου τύπου παρά με αυτόν του μεταλλαγμένου στελέχους με την μετάλλαξη U2504A.

Σύμφωνα με τα δεδομένα της CLSI, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση λινεζολίδης (MIC) για το στέλεχος αγρίου τύπου είναι 5 µg/ml, για το μεταλλαγμένο στέλεχος με την μετάλλαξη G2576U 24 µg/ml και για το μεταλλαγμένο στέλεχος με την μετάλλαξη U2504A >256 µg/ml. Ο βαθμός της σταθερότητας της πρόσδεσης της λινεζολίδης στην 50S αναμένεται να εξηγεί τον βαθμό ανθεκτικότητας του *S.epidermidis* στο αντιβιοτικό. Όσο σταθερότερη η πρόσδεση τόσο μικρότερη θα πρέπει να είναι η απαιτούμενη ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού για καταστολή. Ωστόσο αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται μόνο στην σύγκριση WT με G2576U (πίνακας 1). Η ενέργεια αλληλεπίδρασης (ηλεκτροστατική + vdW) στο

στέλεχος αγρίου τύπου είναι κατά 13.6 kcal/mol αρνητικότερη από αυτήν του μεταλλαγμένου στελέχους με την μετάλλαξη G2576U. Από την άλλη, η μετάλλαξη U2504A δεν φαίνεται να διαφοροποιείται από την G2576U ως προς την ενέργεια αλληλεπίδρασης, παρ' ότι εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, ανατρέποντας εν μέρει την υπόθεση που διατυπώσαμε. Ωστόσο, η διαφορά των μεταλλαγμένων μορφών στην ανθεκτικότητα ίσως να μπορεί να εξηγηθεί όχι ενεργειακά αλλά δομικά. Εξετάζοντας την διάταξη πρόσδεσης της λινεζολίδης στον θύλακα της περιοχής V, διαπιστώνουμε μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο μεταλλαγμένων στελεχών. Ένας από τους μηχανισμούς που προτείνονται για τον τρόπο δράσης της λινεζολίδης είναι ότι παρεμποδίζει την πρόσδεση του tRNA στην θέση P καταλαμβάνοντας μέρος του θύλακα. Η μετάλλαξη U2504A φαίνεται να προκαλεί δέσμευση του αντιβιοτικού σε θέση που να επιτρέπει εν μέρει την πρόσδεση του tRNA.

Άλλοι λόγοι στους οποίους να οφείλεται η μερική ασυμφωνία των τιμών του πίνακα 1 σε σχέση με τις εργαστηριακές παρατηρήσεις μπορεί να είναι:

1. Μη ορθή παραμετροποίηση της λινεζολίδης. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήσαμε δεν έχουν τελειοποιηθεί ακόμα.
2. Η προσομοίωση έγινε σε στέλεχος της *E.coli* και όχι σε στέλεχος του *S. epidermidis*.
3. 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].

3.4 Συμπέρασμα

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε μία προσπάθεια κατανόησης σε ατομικό επίπεδο της ανθεκτικότητας του *Staphylococcus epidermidis* με τις μεταλλάξεις U2504A και G2576U στο 23S rRNA. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 3.1, λόγω του εξαιρετικά μεγάλου πλήθους των ατόμων του συστήματος 50S / λινεζολίδη που μελετήσαμε, δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω συνέχιση των προσομοιώσεων για την εξαγωγή ασφαλέστερων

αποτελεσμάτων με δεδομένη πάντα την διαθέσιμη υπολογιστική ισχύ. Παρόλ' αυτά, τα αποτελέσματά μας ενθαρρύνουν την περαιτέρω μελέτη του συστήματος μετά την τελειοποίηση της παραμετροποίησης της λινεζολίδης.

Βιβλιογραφία:

- [1] http://wiki.medpedia.com/Staphylococcus_epidermidis
- [2] http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_epidermidis
- [3] Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του επιδερμικού σταφυλόκοκκου (*Staphylococcus epidermidis*). ΠΑΝΤΕΛΗΣ Β.ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΥΛΑΚΗΣ, PhD ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
- [4] ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ II Berg, Tymoczko, Stryer Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2006
- [5] Lewin B. .Genes VIII , Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., 2004
- [6] Molecular Cell Biology. 4th edition. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. New York: W. H. Freeman, 2000.
- [7] ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ Madigan, Martinko, Parker Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2005
- [8] Oxazolidinone Resistance Mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* Reveal the Central Region of Domain V as the Primary Site of Drug Action. Liqun Xiong, Patricia Kloss, Stephen Douthwaite, Niels Møller Andersen, Steven Swaney, Dean L. Shinabarger, and Alexander S. Mankin, Journal of Bacteriology, (2000), p. 5325-5331, Vol. 182, No. 19
- [9] <http://el.wikipedia.org/wiki/αντιβιοτικό>
- [10] ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
- [11] Λινεζολίδη- Εκπρόσωπος των Οξαζολιδινονών, μιας καινούργιας κατηγορίας αντιβιοτικών, Ελληνική Ιατρική (2008), 74, 3: 192 - 201
- [12] Wilson, D.N., Schluenzen, F., Harms, J.M., Starosta, A., Connell, S.R. and Fucini, P.. The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyltransferase center and effect tRNA positioning, Proc Natl Acad Sick U S A. (2008) ; 105(36): 13339–13344.
- [13] <http://en.wikipedia.org/wiki/Linezolid>
- [14] The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning Daniel N. Wilson, Frank Schluenzen, Joerg M. Harms, Agata L. Starosta, Sean R. Connell, and Paola Fucini, edited by V. Ramakrishnan, Medical Research Council, Cambridge, United Kingdom, 2008
- [15] Meka, V.G. and Gold, H.S. (2004). Antimicrobial resistance to Linezolid. Antimicrobial Resistance 39, 1010-1015.

[16] Resistance to Linezolid: Characterization of Mutations in rRNA and Comparison of Their Occurrences in Vancomycin-Resistant Enterococci Jason Prystowsky, Farida Siddiqui, John Chosay, Dean L. Shinabarger, John Millichap, Lance R. Peterson, and Gary A. Noskin, *Antimicrob Agents Chemother*; 45(7): 2154–2156, 2001

[17] Molecular dynamics simulations of biomolecules. Martin Karplus and J. Andrew McCammon, *Nature Structural Biology*, volume 9, number 9:646-652, 2002

[18] <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

[19] <http://staff.science.nus.edu.sg/~phywjs/lecture-notes/cpnote3.pdf>

[20] Introduction to Molecular Dynamics Simulation
Michael P. Allen, John von Neumann Institute for Computing, p.1-4, 2004

[21] "NAMD tutorial", University of Illinois at Urbana-Champaign, NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics, Beckman Institute, Computational Biophysics Workshop, 2007

[22] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>, Phillips et al., *J. Comp. Chem.* 26:1781-1802 (2005)

[23] http://en.wikipedia.org/wiki/23S_ribosomal_RNA

[24] <http://www.ch.embnet.org/index.html>

[25] Τζιαστούδη Μαρία, «Παραμετροποίηση του αντιβιοτικού λινεζολίδιο για το Charmm force field. Προσομοίωση της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας από E.coli μαζί με λινεζολίδιο.», Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας (2011).

Παράρτημα:

A) Το script για την δημιουργία psf αρχείων: psf_50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.txt

```
#package require psfgen
topology top_all127_prot_na_ZLD .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,
0, 1, 2, 3, 4, MG, HOH

writepdb 50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.pdb
writepdb 50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.psf

```

B) Το script για την διαλυτοποίηση: solvate_50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.txt

```

Water Sphere tcl Script

# finds a center of mass of the molecule (Y0.pdb), place a sphere of
water
# around it.

# To run execute: vmd -dispdev text -e solvate_Y0.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_ZLD.psf
set pdb          50S_wt_no_B2096-2188_H_ZLD.pdb
set box          50S_wt_box
set psfDrop      50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.psf
set pdbDrop      50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.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 num0 9999
set Rmin 0.0

while {$num0 != 0} {
set Rmin [expr $Rmin +1.0]

set probSel [atomselect top "not (sqr(x-$xmass) + sqr(y-$ymass) +
sqr(z-$zmass) <= sqr($Rmin))"]
set num0 [$probSel num]
puts "$num0 $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

```

Γ) Το script για την ελαχιστοποίηση: min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt

```

# NAMD CONFIGURATION FILE FOR neutr_head_ws.pdb in water sphere

# protocol params

# initial config

```

```

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

# output params
outputname       min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD
Binaryoutput     no
# integrator params
timestep 1.0

# force field params
structure 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.psf
paraTypeCharmm on
parameters      par_all127_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_ZLD.ref
fixedAtomsCol  B

```

```
minimize 4000
```

Δ) Το script για την εξισορρόπηση: eq_50s_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt

```

#####
### JOB DESCRIPTION
#####
## ADJUSTABLE PARAMETERS
#####
binaryrestart no
structure 50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.psf
Coordinates min_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.coor
set temperature 300
set outputname eq_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD

firsttimestep 0
#####
## SIMULATION PARAMETERS
#####
# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_all127_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
dcdfreq 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
sphericalBCexpl 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

```

Πρόκειται για ένα script με μία μικρή ελαχιστοποίηση ενέργειας 100 βημάτων αρχικά. Εάν δεν επιθυμούμε την ελαχιστοποίηση ενέργειας προσθέτουμε «#» μπροστά από το «minimize 100». Το συγκεκριμένο αρχείο κειμένου περιέχει την εντολή για μία εξισορρόπηση 50.000 βημάτων. Για να συνεχιστεί η παραπάνω εξισορρόπηση πληκτρολογούμε την εντολή: bincoordinates «όνομα αρχείου coor που προέκυψε από την τελευταία εξισορρόπηση» κάτω από την εντολή coordinates στο αρχείο κειμένου, π.χ.: bincoordinates eq_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD_1.coor.

E) Απόσπασμα από το αρχείο κειμένου log_eq_50S_wt_no_B2096-2188_H_ws_ZLD.txt που μας παρουσιάζει την εξέλιξη της εξισορρόπησης ανά 100 βήματα. Στην εξισορρόπηση που εξελίσσεται στο παρακάτω αρχείο κειμένου έχει προηγηθεί ελαχιστοποίηση ενέργειας 100 βημάτων.

```

LDB: ===== START OF LOAD BALANCING ===== 5307.91
LDB: TIME 5307.93 LOAD: AVG 133.936 MAX 141.615 PROXIES: TOTAL 82 MAXPE 82 MAXPATCH 1
None 37.5065
LDB: TIME 5308.48 LOAD: AVG 133.936 MAX 140.493 PROXIES: TOTAL 82 MAXPE 82 MAXPATCH 1
RefineTorusLB 37.5065
LDB: ===== END OF LOAD BALANCING ===== 5308.49

Info: Initial time: 2 CPUs 2.26875 s/step 13.1293 days/ns 273.79 MB memory
LDB: ===== START OF LOAD BALANCING ===== 5428.23
LDB: TIME 5428.27 LOAD: AVG 147.1 MAX 152.17 PROXIES: TOTAL 82 MAXPE 82 MAXPATCH 1
None 44.4958
LDB: TIME 5428.7 LOAD: AVG 147.1 MAX 152.17 PROXIES: TOTAL 82 MAXPE 82 MAXPATCH 1
RefineTorusLB 44.4958
LDB: ===== END OF LOAD BALANCING ===== 5428.71

PRESSURE: 200 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSURE: 200 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
PRESSAVG: 200 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSAVG: 200 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Info: Initial time: 2 CPUs 2.41 s/step 13.9467 days/ns 274.674 MB memory
ENERGY: 200 39084.8053 103866.4018 112426.2446 2851.2654 -609405.3707 -
1874.9790 0.0000 0.0000 93743.5123 -259308.1203 226.3481 -353051.6327
-258592.2531 202.0375

Info: Initial time: 2 CPUs 2.99101 s/step 17.3091 days/ns 275.038 MB memory
PRESSURE: 300 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSURE: 300 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
PRESSAVG: 300 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSAVG: 300 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Info: Benchmark time: 2 CPUs 2.0915 s/step 12.1036 days/ns 275.399 MB memory
ENERGY: 300 41931.5436 109645.3298 113617.2764 3097.6194 -606937.3801 -
2150.0028 0.0856 0.0000 106238.7817 -234556.7463 256.5185 -340795.5280
-233569.8551 243.4671

Info: Benchmark time: 2 CPUs 2.10644 s/step 12.1901 days/ns 275.683 MB memory
PRESSURE: 400 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSURE: 400 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
PRESSAVG: 400 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSAVG: 400 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
Info: Benchmark time: 2 CPUs 2.08852 s/step 12.0863 days/ns 275.909 MB memory
ENERGY: 400 43399.9160 113125.9344 114251.1452 3230.5400 -605461.5577 -
2180.5781 0.0000 0.0000 112170.4482 -221464.1520 270.8408 -333634.6002
-220380.9229 264.8547

PRESSURE: 500 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSURE: 500 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
PRESSAVG: 500 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSAVG: 500 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
ENERGY: 500 44118.4176 115270.7171 114649.7128 3334.3225 -605285.7892 -
1792.5685 0.0007 0.0000 115923.6892 -213781.4977 279.9031 -329705.1870
-212645.5967 276.5109

WRITING EXTENDED SYSTEM TO RESTART FILE AT STEP 500
OPENING COORDINATE DCD FILE
WRITING COORDINATES TO DCD FILE AT STEP 500
WRITING COORDINATES TO RESTART FILE AT STEP 500
FINISHED WRITING RESTART COORDINATES
WRITING VELOCITIES TO RESTART FILE AT STEP 500
FINISHED WRITING RESTART VELOCITIES
PRESSURE: 600 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSURE: 600 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

```

```
PRESSAVG: 600 0 0 0 0 0 0 0 0
GPRESSAVG: 600 0 0 0 0 0 0 0 0
ENERGY: 600 44784.8770 116275.9779 114816.8293 3312.7888 -603932.1080 -
2525.6797 0.0000 0.0000 118441.0034 -208826.3113 285.9813 -327267.3147
-207630.4241 283.5222
```

ΣΤ) Το script για τον υπολογισμό της μεταβολής του RMSD: rmsd_dcd.txt

```
# 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
```

Z) Τμήμα της ομοπαράθεσης του 23s rRNA (νουκλεοτίδιο υπ' αριθμόν 2400 έως νουκλεοτίδιο υπ' αριθμόν 2700, με βάση την αρίθμηση στην E. coli) του Staphylococcus epidermidis με το 23s rRNA της E. Coli.

```

                2430      2440      2450      2460      2470      2480
staphy GTGGTTCGCATGGAAGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGC
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
e coli GTGGTCTGAATGGAAGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGC
2400      2410      2420      2430      2440      2450

                2490      2500      2510      2520      2530      2540
staphy TTATCTCCCCAAGAGTTCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
e coli TGATACCGCCAAGAGTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCA
2460      2470      2480      2490      2500      2510

                2550      2560      2570      2580      2590      2600
staphy CATCCTGGGGCTGTAGTCCGATCCCAAGGGTGGGGCTGTTCGCCCATTTAAAGCGGTACGCG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
e coli CATCCTGGGGCTGAAGTAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCGCCCATTTAAAGTGGTACGCG
2520      2530      2540      2550      2560      2570

                2610      2620      2630      2640      2650      2660
staphy AGCTGGGTTTCAAGACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCCGTCGTGGGCGTAGGAAATT
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
e coli AGCTGGGTTTCAAGACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCTGCCGTGGGCGTAGGAGAAC
2580      2590      2600      2610      2620      2630
```

```

                2670      2680      2690      2700      2710      2720
staphy TGAGAGGAGCTGTCCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACATACCTCTGGTGTACCAGTT
      :::: : : :::: : : ::::: : : : ::::: : : : ::::: : : :
e coli  TGAGGGGGGCTGCTCCTTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACGCATCACTGGTGTTCGGGTT
      2640      2650      2660      2670      2680      2690

```

H) Τμήμα της ομοπαράθεσης του 23s rRNA (νουκλεοτίδιο υπ' αριθμόν 2400 έως νουκλεοτίδιο υπ' αριθμόν 2700, με βάση την αρίθμηση στον *Staphylococcus epidermidis*) του *Staphylococcus epidermidis* με το 23s rRNA του *Haloarcula Marismortui*.

```

                2400      2410      2420      2430      2440      2450
staphy CGAAAGACGGACTTAGTGATCCGGTGGTTCCGCATGGAA-GGGCCATCGCTCAACGGATA
      ::::: : : ::: : : : : : : : : : : : : : : : : :
haloar  CGAAAGCGTGGTCTAGCGAACCAATTAGCCTGCTTGATGCGGGCAATTGATGACAG---A
      2410      2420      2430      2440      2450      2460

```

```

                2460      2470      2480      2490      2500      2510
staphy AAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACATCGACGGGGAGGTT
      ::::: : : ::::: : : : : : : : : : : : : : : : :
haloar  AAAGCTACCCCTAGGGATAACAGAGTCGTCACCTCGCAAGAGCACATATCGACCGAGTGGCT
      2470      2480      2490      2500      2510      2520

```

```

                2520      2530      2540      2550      2560      2570
staphy TGGCACCTCGATGTCGGCTCATCGCATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAAGGGTTGGGCT
      :: : ::::: : : : : : : : : : : : : : : : :
haloar  TGCTACCTCGATGTCGGTTCCTCCATCCTGCCCGTGCAGAAGCGGGCAAGGGTGAGGTT
      2530      2540      2550      2560      2570      2580

```

```

                2580      2590      2600      2610      2620      2630
staphy GTTCGCCCATTTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCC
      ::::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
haloar  GTTCGCCATTTAAAGGAGGTCGTGAGCTGGGTTTAGACCGTCGTGAGACAGGTCGGCTGC
      2590      2600      2610      2620      2630      2640

```

```

                2640      2650      2660      2670      2680      2690
staphy TATCCGTCGTGGGCGTAG-GAAATTTGAGAGGAGCTGTCCT-TAGTACGAGAGGACCG--
      :::: : : : ::: : : : : : : : : : : : : : : : :
haloar  TATCTACTGGGTGTGTAATGGTGTCTGACAAGAACGACCGTATAGTACGAGAGGAACTAC
      2650      2660      2670      2680      2690      2700

```



```

                2490      2500      2510      2520      2530      2540
staphy TATCTCCCCAAGAGTTCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCATCGC
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
thermu GATCTCCCCCGAGCGTCCACAGCGCGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGGCTCGTTCGC
      2470      2480      2490      2500      2510      2520

                2550      2560      2570      2580      2590      2600
staphy ATCCTGGGGCTGTAGTCGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTTCGCCCATTAAAGCGGTACGCGA
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
thermu ATCCTGGGGCTGAAGAAGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTTCGCCCATTAAAGCGGCACGCGA
      2530      2540      2550      2560      2570      2580

                2610      2620      2630      2640      2650      2660
staphy GCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCCGTCGTGGGCGTAGGAAATTT
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
thermu GCTGGGTTCAGAACGTCGTGAGACAGTTCGGTCTCTATCCGCCACGGGCGCAGGAGGCTT
      2590      2600      2610      2620      2630      2640

                2670      2680      2690      2700      2710      2720
staphy GAGAGGAGCTGTCCTTAGTACGAGAGGACCGGGATGGACATACCTCTGGTGTACCAGTTG
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
thermu GAGGGGGGCTCTTCTTAGTACGAGAGGACCGGAAGGGACGCACCTCTGGTTTCCAGCTG
      2650      2660      2670      2680      2690      2700

```

Γλωσσάριο:

- **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 δέσμησης 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 εμπεριέχονται 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.

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα πρώτα από όλα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για την άριστη συνεργασία και την άψογη επικοινωνία που είχαμε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνεπιβλέποντες καθηγητές μου, κ. Μαρία Κοντού και κ. Δημήτριο Λεωνίδα καθώς και την κ. Ευθυμία Πετεινάκη από το τμήμα της Ιατρικής, η οποία ενθάρρυνε αυτήν τη μελέτη. Πρέπει επίσης να ευχαριστήσω την Μαρία Τζιαστούδη για την συμβολή της στην δημιουργία των παραμέτρων της λινεζολίδης, τον Στυλιανό Φλώρο για τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας, Βασίλη Παλιό, Νίκο Νικολεουσάκο, Βίκυ Στάθη και Δήμητρα Παπαθανασίου για την άριστη συνεργασία που είχαμε. Τέλος, θα πρέπει να ευχαριστήσω τους γονείς μου, τον παππού μου και τη γιαγιά μου για όλα αυτά που μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια και με έχουν βοηθήσει να φτάσω εδώ που είμαι.

Νάγια σε ευχαριστώ που με στηρίζεις και είσαι δίπλα μου σε ό,τι δυσκολίες έχω αντιμετωπίσει.