



«ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»



«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

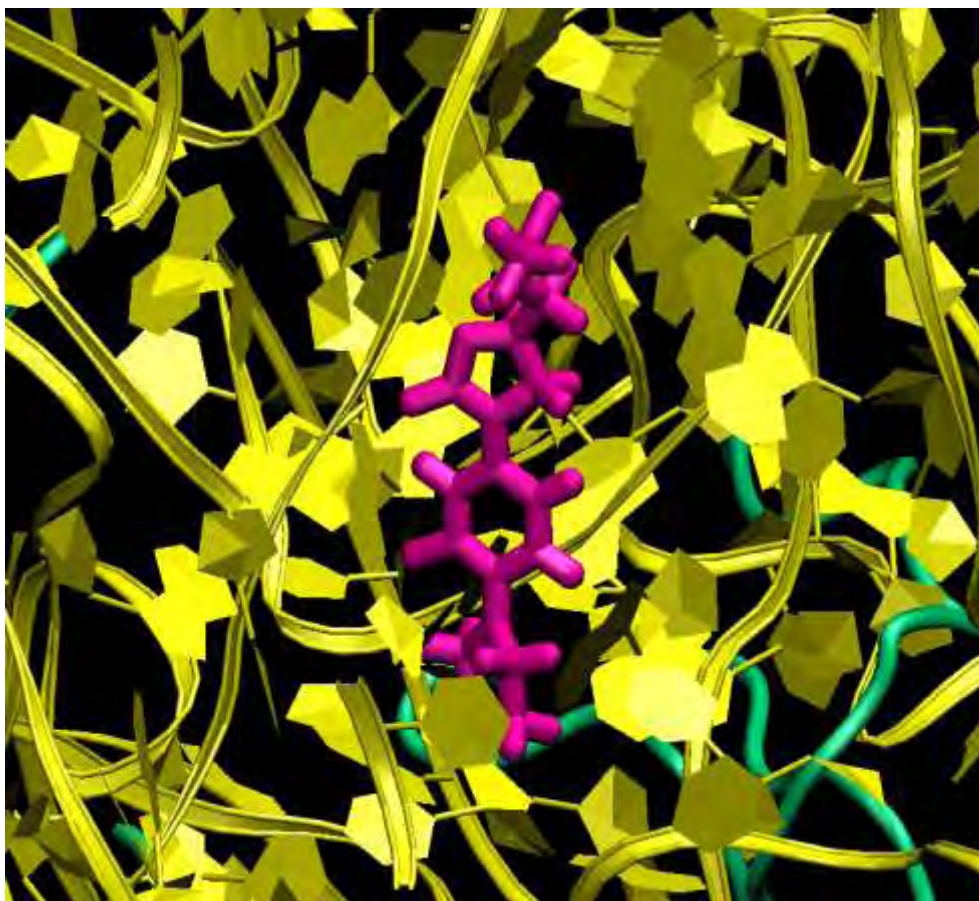
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»

« ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »

ΤΖΙΑΣΤΟΥΔΗ ΜΑΡΙΑ

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

"Παραμετροποίηση του αντιβιοτικού λινεζολίδιο για το CHARMM force field και προσομοίωση της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας από *E. coli* με την παρουσία του λινεζολιδίου"



ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης

"Παραμετροποίηση του αντιβιοτικού λινεζολίδιο για το CHARMM force field και προσομοίωση της 50S ριβοσωματικής υπομονάδας από *E. coli* με την παρουσία του λινεζολιδίου"

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Επιβλέπων καθηγητής

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

Τριμελής επιτροπή

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

Παπαδόπουλος Γεώργιος (συνεπιβλέπων), Λέκτορας Βιοφυσικής με έμφαση στη Μελέτη της Δομής και της Λειτουργίας των Πρωτεϊνών, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

Πτερινάκη Ευθυμία (συνεπιβλέπων), Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Π. Θ.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους καθηγητές μου για τις γνώσεις που μου προσέφεραν και ιδιαίτερα στην τριμελή επιτροπή, κ. Λεονίδα Δημήτριο, κ. Παπαδόπουλο Γεώργιο και κα. Πετεινάκη Ευθυμία, που μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με αυτό το θέμα.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παπαδόπουλο Γεώργιο για τη βοήθειά του, την άριστη συνεργασία και τις υποδείξεις του, που συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

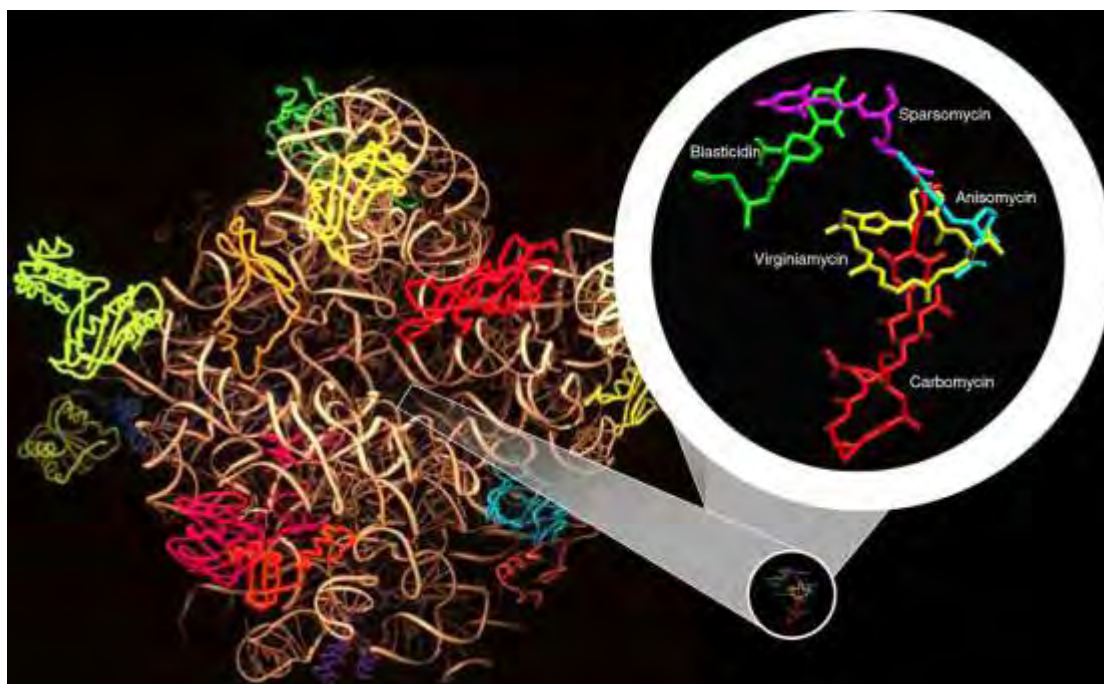
Περιεχόμενα	1
Εισαγωγή	4
Σκοπός	6
Περίληψη	6
Abstract	7
Θεωρητικό μέρος	8
1. Ο στόχος: το βακτηριακό ριβόσωμα	9
2. Βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση	10
2.1 Σχηματισμός αμινοακυλο-tRNA	10
2.2 Εκκίνηση	11
2.3 Επιμήκυνση	13
2.4 Τερματισμός	15
3. Αντιβιοτικά	16
3.1 Μηχανισμός δράσης	17
3.2 Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση	19
4. Οξαζολιδινόνες	22
4.1 Λινεζολίδη	24
4.1.1 Χημεία	24
4.1.2 Μηχανισμός δράσης	25
4.1.3 Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης	26
4.1.4 Το λινεζολίδιο στην κλινική χρήση	27
4.1.5 Οξαζολιδινόνες και ανθεκτικότητα	30
5. Σταφυλόκοκκος	31
5.1 Βιολογία	31
5.2 Επιδημιολογία και παθογένεση	32
5.3 Θεραπεία και πρόληψη	34
5.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
6. Προσομοιώσεις	35
6.1 Συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας	37
6.2 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής	38

6.3	Εκτέλεση μιας προσομοίωσης	39
6.3.1	Προσδιορισμός αρχικών τιμών	39
6.3.2	Επιλογή του κατάλληλου βήματος ολοκλήρωσης.....	40
6.3.3	Σταθερότητα ολοκλήρωσης.....	41
6.3.4	Έξυπνα τεχνάσματα για να βελτιωθούν η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής	41
6.4	Προηγμένες τεχνικές και μελλοντική κατεύθυνση	42
7.	Μη αυτόματη παραμετροποίηση.....	42
7.1	Αρχείο τοπολογίας.....	43
7.2	Αρχείο παραμέτρων	48
7.2.1	Προσδιορισμός αρχικών τιμών για τις άγνωστες παραμέτρους	50
	Μια ματιά στις παραμέτρους των διεδρων γωνιών.....	50
8.	Παραμετροποίηση με το πρόγραμμα Swissparam	53
	Πειραματικό μέρος.....	54
9.	Αρχείο τοπολογίας	55
10.	Αρχείο παραμέτρων.....	58
11.	Τα βήματα των προσομοιώσεων για την ελεύθερη λινεζολίδη	60
11.1	Δημιουργία αρχείου psf.....	60
11.2	Ενυδάτωση	60
11.3	Προσθήκη ιόντων	61
11.4	Ελαχιστοποίηση ενέργειας.....	63
11.5	Εξισορρόπηση	64
12.	Τα βήματα των προσομοιώσεων για το σύστημα 50S-λινεζολίδη	66
	Αποτελέσματα	68
13.	Αποτελέσματα μη αυτόματης παραμετροποίησης	69
14.	Αποτελέσματα αυτόματης παραμετροποίησης (με το Swissparam)	73
15.	Συζήτηση.....	76
	Βιβλιογραφία	82
	Παράρτημα.....	89
1.	Ομοπαράθεσεις.....	90
A)	Σταφυλόκοκκου – <i>E. coli</i>	90
B)	Σταφυλόκοκκου- <i>D. radiodurans</i>	92
Γ)	Σταφυλόκοκκου – <i>Haloarcula</i>	93

2. Το αρχείο τοπολογίας της λινεζολίδης.....	94
2.1 από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση	94
2.2 από το Swissparam (αυτόματη παραμετροποίηση)	97
3. Το αρχείο παραμέτρων της λινεζολίδης	102
3.1 από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση	102
3.2 από το Swissparam (αυτόματη παραμετροποίηση)	105
4. Τα script που χρησιμοποιήθηκαν	107
4.1 Το script που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του psf.....	107
4.2 Το script για τη διαλυτοποίηση.....	112
4.3 Το script για την προσθήκη ιόντων	114
4.4 Το script για την ελαχιστοποίηση	116
4.5 Το script για την εξισορρόπηση.....	117
4.6 Το script για τον υπολογισμό του RMSD.....	118

Εισαγωγή

Τα σύμπλοκα των ριβοσωμικών υπομονάδων με τα διάφορα αντιβιοτικά είναι πολύ σημαντικά, γιατί μας βοηθούν να κατανοήσουμε τους μοριακούς μηχανισμούς πρόσδεσης των αντιβιοτικών, τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας, καθώς και για τον λογικό σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Επιπλέον, τα αντιβιοτικά υπήρξαν ιδιαίτερα χρήσιμα στην προσπάθεια κατανόησης της διαδικασίας της πρωτεϊνοσύνθεσης [1].



Εικόνα 1: Απεικονίζονται οι προσανατολισμοί διάφορων αντιβιοτικών που είναι συνδεδεμένα στο PTC του *H. marismortui*. Αριστερά φαίνεται η 50S υπομονάδα, με καφέ απεικονίζεται το RNA και με διάφορα χρώματα απεικονίζονται οι διάφορες ριβοσωμικές πρωτεΐνες [2].

Είναι γεγονός ότι υπάρχει μια συνεχής ανάγκη για νέα αντιμικροβιακά φάρμακα, η οποία οφείλεται στην αναπόφευκτη ανάπτυξη ανθεκτικότητας, που ακολουθεί την εισαγωγή ενός αντιβιοτικού στην κλινική πράξη. Συγκεκριμένα, όταν εισάγεται μια νέα κατηγορία αντιβιοτικού, είναι αποτελεσματική στην αρχή, αλλά στη συνέχεια εμφανίζονται ανθεκτικά βακτήρια λόγω κάποιου εγγενούς ή επίκτητου μηχανισμού ανθεκτικότητας [3]. Για παράδειγμα, τη δεκαετία 1940, οι σταφυλοκοκκικές μολύνσεις θεραπεύονταν με τις πενικιλίνες πρώτης γενιάς. Μέσα σε έναν χρόνο, ο *Staphylococcus aureus* ανέπτυξε ανοχή και μια δεκαετία αργότερα, η ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες οδήγησε στην ανάπτυξη και είσοδο της μεθικιλίνης. Όμως, οι ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκοι έγιναν τόσο διαδεδομένοι, ώστε το 1986 η βανκομυκίνη έγινε το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής για τη θεραπεία αυτών των

μολύνσεων. Από τότε, οι MRSA έγιναν VRSA και τέλη της δεκαετίας 1990 εγκρίθηκαν ο συνδυασμός κουινοπριστίνης/ δαλφοπριστίνης (Synercid) και η λινεζολίδη (Zynox) ως νέες θεραπευτικές επιλογές [3].

Οι σταφυλόκοκκοι κατατάσσονται μεταξύ των πιο κοινών παθογόνων που προκαλούν βακτηριακές λοιμώξεις στην κοινότητα προκαλώντας περισσότερες από ένα εκατομμύριο μολύνσεις κάθε χρόνο παγκοσμίως [4]. Ο *Staphylococcus epidermidis* που μέχρι τώρα θεωρούνταν ένας άκακος μικροοργανισμός, εξελίχθηκε σε ένα σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο. Μαζί με τον ακόμα πιο παθογόνο ξάδερφό του, *Staphylococcus aureus*, κατατάσσεται πρώτος μεταξύ των υπαίτιων παθογόνων νοσοκομειακών μολύνσεων [5].

Όσον αφορά στη λινεζολίδη, έχουν διατυπωθεί αρκετά σενάρια για τον μηχανισμό δράσης της, τα οποία καλύπτουν όλα τα στάδια της μετάφρασης.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες της λινεζολίδης στο αρχαίο *H. marismortui* και στο βακτήριο *D. radiodurans* έδειξαν ότι προσδένεται στη θέση A του κέντρου πεπτιδυλομεταφοράς [6,7]. Βάσει πειραματικών ευρημάτων που αφορούν ανθεκτικά στη λινεζολίδη στελέχη *Staphylococcus epidermidis* [8,9] και *Escherichia coli* [10], προκειμένου να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης της, μελετήθηκε στο πλαίσιο αυτής της εργασίας η αλληλεπίδρασή της με τη ριβοσωματική υπομονάδα 50S στελεχών *Escherichia coli* αγρίου τύπου με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Τα αποτελέσματα μπορούν να αναχθούν και στον *S. epidermidis* εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού ομοιότητας της περιοχής V του 23S rRNA, όπου προσδένεται η λινεζολίδη (παράρτημα-ομοπαράθεσεις). Ενδεικτικό της σημασίας που απέδωσε η επιστημονική κοινότητα στις δομικές μελέτες του ριβοσώματος είναι η απονομή του βραβείου νομπέλ Χημείας 2009 στους Ada E. Yonath, Venkatraman Ramakrishnan και Thomas A. Steitz για το έργο τους στη δομή και λειτουργία του ριβοσώματος.

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η παραμετροποίηση της λινεζολίδης μη αυτόματα για το πεδίο δυνάμεων CHARMM27, προκειμένου να καταστούν δυνατές οι προσομοιώσεις στο σύστημα 50S-λινεζολίδης, τόσο σε αγρίου τύπου, όσο και σε μεταλλαγμένα στελέχη του *Staphylococcus epidermidis*, τα οποία εμφανίζουν αντοχή στο αντιβιοτικό. Οι προσομοιώσεις αυτές θα συνεισφέρουν στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης της λινεζολίδης. Η λινεζολίδα παραμετροποιήθηκε επίσης και με τη βοήθεια του προγράμματος Swissparam (αυτόματα) και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα.

Περίληψη

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας παραμετροποιήθηκε μη αυτόματα η λινεζολίδα για το CHARMM27 FF αλλά και αυτόματα με τη βοήθεια του Swissparam και μελετήθηκε με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρά με την 50S ριβοσωμική υπομονάδα του *Escherichia coli*. Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις ήταν το namd2.7.2. Η προετοιμασία των αρχείων pdb έγινε με το πρόγραμμα VMD. Οι δομές που προέκυψαν από τις προσομοιώσεις συγκρίθηκαν με τις πειραματικά προσδιορισμένες δομές μέσα στο θύλακα του ριβοσώματος, όπως έχουν κρυσταλλογραφηθεί στους οργανισμούς *Haloarcula marismortui* (pdb: 3CPW) και *Deinococcus radiodurans* (pdb: 3DLL). Όσον αφορά στα αποτελέσματα της έρευνας, οι παράμετροι που δημιουργήθηκαν μη αυτόματα αποδίδουν πλήρως την κρυσταλλική δομή της ελεύθερης λινεζολίδης (RMSD=0.69), αλλά δεν αποδίδουν ακριβώς την δομή μέσα στο ριβόσωμα (RMSD=2.82 όταν συγκρίνεται με τη δομή στο *H. marismortui*, RMSD=4.07 όταν συγκρίνεται με τη δομή στο *D. radiodurans*). Αντίθετα, οι παράμετροι του Swissparam αποδίδουν την δομή μέσα στο θύλακα του ριβοσώματος καλύτερα, αλλά δεν αναπαράγουν πολύ καλά την ελεύθερη μορφή της (RMSD=4.32).

Abstract

In this study we parameterized linezolid for the CHARMM force field manually and automatic with Swissparam and studied with molecular dynamics simulations the mode of binding in 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. The program that executed the simulations was namd2.7.2. For the preparation of pdb files was used the program VMD. The obtained structures were compared with the crystal structures of linezolid in 50S of *Haloarcula marismortui* (pdb: 3CPW) and *Deinococcus radiodurans* (pdb: 3DLL). Concerning the results of this study, the parameters that were developed reproduce well the free crystal form of linezolid (RMSD=0.69), but they do not reproduce well the structure in 50S. In contrary to this, parameters from Swissparam reproduce the structure in 50S, but not its free crystal form (RMSD=4.32).

Θεωρητικό μέρος

1. Ο στόχος: το βακτηριακό ριβόσωμα

Το ριβόσωμα της *E. coli* έχει συντελεστή καθίζησης 70S και αποτελείται από μια μεγάλη υπομονάδα 50S και μια μικρή υπομονάδα 30S. Οι υπομονάδες αυτές μπορούν ακόμη να χωριστούν στις πρωτεΐνες και τα rRNA που τις αποτελούν. Η υπομονάδα 30S περιέχει 21 διαφορετικές πρωτεΐνες (που αναφέρονται από S1 έως S21) και ένα μόριο RNA 16S. Η υπομονάδα 50 S περιέχει 34 διαφορετικές πρωτεΐνες (L1 έως L34) και δύο είδη μορίων RNA, ένα 23 S και ένα 5 S. Ένα ριβόσωμα περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε είδος μορίου RNA, δύο αντίγραφα των πρωτεϊνών L7 και L12 και ένα αντίγραφο από κάθε άλλη πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη L7 είναι ίδια με την L12 εκτός του ότι το αμινο-τελικό άκρο της είναι ακετυλιωμένο. Μόνο μία πρωτεΐνη είναι κοινή και στις δύο υπομονάδες: η S20 είναι ίδια με την L26 [11].

Το υψηλά συντηρημένο ενεργό κέντρο του ριβοσώματος [12], το κέντρο πεπτιδυλομεταφοράς (PTC), βρίσκεται κοντά στη διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων και αποτελείται αποκλειστικά από rRNA, όπως και το κέντρο αποκωδικοποίησης [13]. Συγκεκριμένα, συνίσταται κυρίως από τμήματα της επικράτειας V του 23S rRNA [14]. Βρίσκεται στη βάση μιας κοιλότητας, η οποία ανοίγει σε μια σήραγγα, η οποία διασχίζει όλη τη μεγάλη υπομονάδα και είναι το μονοπάτι που ακολουθεί κάθε νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη [13]. Τα τοιχώματά του αποτελούνται από τους βρόγχους (των θέσεων) A και P [12].

Ο θύλακας του PTC και το περιβάλλον του βρίσκονται στο μέσο μιας αρκετά μεγάλης συμμετρικής περιοχής που αποτελείται από περίπου 180 νουκλεοτίδια [13]. Αυτή η συμμετρική περιοχή περικλείει το PTC και τον άξονα συμμετρίας του, ο οποίος περνάει ανάμεσα από τους βρόγχους A και P και σχεδόν συμπίπτει με τον εκτενή άξονα του τούνελ εξόδου. Η απαίτηση να προσφέρει συγκρίσιμα υποστηρικτικά περιβάλλοντα σε δυο παρόμοιες χημικές οντότητες σε έναν προσανατολισμό που να επιτρέπει το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, δικαιολογεί την εσωτερική συμμετρία. Αυτή η περιοχή συνδέει, άμεσα ή μέσω των προεκτάσεών της, όλες τις λειτουργικές περιοχές της μεγάλης υπομονάδας, δηλαδή τις θέσεις εισόδου και εξόδου των tRNA, το κέντρο πεπτιδυλομεταφοράς, την ατραπό εξόδου της πρωτεΐνης, με το κέντρο αποκωδικοποίησης της μικρής υπομονάδας (μέσω της γέφυρας B2α μεταξύ των δύο υπομονάδων, η οποία είναι η άκρη της έλικας H69). Αυτή η κεντρική του τοποθέτηση προτείνει ότι παρέχει ένα ενδοριβοσωμικό σύστημα σηματοδότησης μεταξύ απομακρυσμένων λειτουργικών περιοχών, ουσιωδών για την ομαλή πορεία του πολυμερισμού [13].

Αν και 15 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την επικράτεια V της μεγάλης υπομονάδας του *H. marismortui*, καμιά πρωτεΐνη δεν βρέθηκε σε απόσταση μικρότερη των 18 Å από το PTC, επιβεβαιώνοντας ότι το ριβόσωμα αποτελεί το μόνο φυσικό ριβοένζυμο με ενεργότητα πολυμεράσης [12,15]. Αν και μεταγενέστερες δομές του 70 S ριβοσώματος του *T. thermophilus* με τρία προσδεμένα μόρια tRNA έδειξαν ότι η πρωτεΐνη L27 αλληλεπιδρά με το άκρο CCA του tRNA της θέσης P, δεν είναι αρκετά κοντά ώστε να συμμετέχει άμεσα στην κατάλυση του πεπτιδικού δεσμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή του PTC είναι η ίδια και στην 50S όπως και στο 70S, καθώς επίσης και ότι όλοι οι ισχυρισμοί σχετικά με τον μηχανισμό σύνθεσης του πεπτιδικού δεσμού που συνάγονται από τη δομή μόνον της 50S είναι σωστοί και ισχύουν και για όλο το ριβόσωμα [12].

2. Βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση

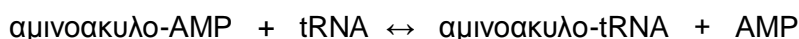
2.1 Σχηματισμός αμινοακυλο-tRNA

Η δομή του tRNA μπορεί να σχεδιαστεί με τη μορφή ενός τριφυλλιού, όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Ένα από τα μεταβλητά τμήματα του μορίου περιέχει το **αντικωδικόνιο**, δηλαδή τη θέση που αναγνωρίζει το κωδικόνιο στο mRNA. Στο άκρο 3', το *άκρο-δέκτη* όλων των μορίων tRNA, υπάρχουν τρία αζευγάρωτα νουκλεοτίδια, η αλληλουχία των οποίων είναι πάντοτε κυτοσίνη-κυτοσίνη-αδενίνη (CCA) και το αμινοξύ προσδέεται ομοιοπολικά μέσω ενός εστερικού δεσμού στη ριβόζη της τερματικής αδενίνης. Από το άκρο-δέκτη του tRNA, το αμινοξύ μεταφέρεται στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα στο ριβόσωμα [16].

Τα αμινοξέα φθάνουν στην αυξανόμενη αλυσίδα με μια ενεργοποιημένη μορφή ως αμινοακυλο-tRNA, τα οποία δημιουργούνται με την ένωση της καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με το 3' άκρο ενός μορίου μεταφορικού RNA. Η σύνδεση ενός αμινοξέος με το αντίστοιχό του tRNA καταλύεται από μια **συνθετάση του αμινοακυλο-tRNA**, ένα ειδικό ένζυμο το οποίο επιτελεί τη σημαντική λειτουργία της αναγνώρισης τόσο του αμινοξέος όσο και του ειδικού για το συγκεκριμένο αμινοξύ μορίου tRNA [1], έτσι ώστε να διασφαλίζει ότι ένα συγκεκριμένο tRNA θα προσλάβει το ορθό αμινοξύ [16]. Η διάσπαση του ATP ωθεί αυτή την αντίδραση ενεργοποίησης. Για κάθε αμινοξύ υπάρχει συνήθως ένα ενεργοποιητικό ένζυμο και τουλάχιστον ένα είδος tRNA. Συγκεκριμένα, η ειδική χημική αντίδραση, λοιπόν, μεταξύ αμινοξέος και tRNA περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του αμινοξέος μέσω αντίδρασης με το ATP:



Το ενεργοποιημένο αμινοξύ μεταφέρεται κατόπιν στο tRNA, για τον σχηματισμό ενός φορτισμένου tRNA:



Έτσι, το ισοδύναμο των δύο μορίων ATP καταναλώνεται για τη σύνθεση κάθε ενός αμινοακυλο-tRNA [11,16]. Ένα από αυτά καταναλώνεται για τον σχηματισμό της εστερικής σύνδεσης του αμινοακυλο-tRNA, ενώ το άλλο καταναλώνεται για την ώθηση της αντίδρασης προς τα εμπρός.

Η διεργασία της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι ανάλογη με τη μετάφραση μιας σελίδας βιβλίου σε μια άλλη γλώσσα. Η πολύπλοκη αυτή διεργασία διεκπεραιώνεται από τη συντονισμένη αλληλεπίδραση περισσότερων από εκατό μακρομορίων, που περιλαμβάνουν mRNA, rRNA, tRNA, συνθετάσες των AA-tRNA και πρωτεϊνικούς παράγοντες [11] που ονομάζονται παράγοντες εκκίνησης, επιμήκυνσης και τερματισμού, καθώς και την τριφωσφορική γουανοσίνη η οποία παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια [16]. Λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα, τα οποία διαδραματίζουν καίριο ρόλο παρέχοντας το περιβάλλον για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των προαναφερθέντων παραγόντων. Τα οργανίδια αυτά συμπεριφέρονται σαν μικρά κινούμενα εργοστάσια, τα οποία προχωρούν κατά μήκος του mRNA καταλύοντας γρήγορους κύκλους σύνθεσης πεπτιδικών δεσμών [15].

Μολονότι, η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μια συνεχής διαδικασία, μπορεί κανείς να τη διαχωρίσει σε έναν αριθμό διακριτών σταδίων, κοινών σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (προκαρυωτικά-ευκαρυωτικά κύτταρα): **εκκίνηση, επιμήκυνση, και τερματισμό-απελευθέρωση.**

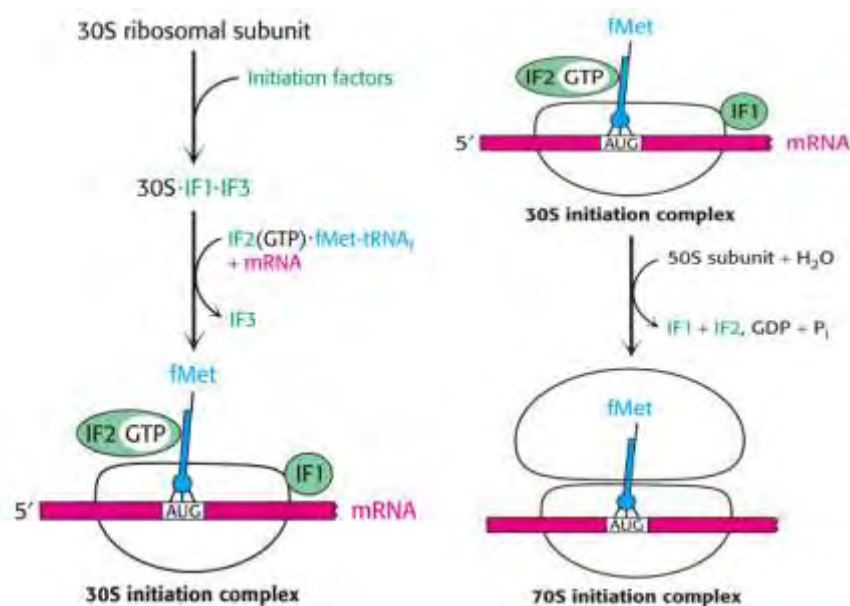
2.2 Εκκίνηση

Στους προκαρυώτες, η εκκίνηση ξεκινά πάντοτε με μια ελεύθερη ριβοσωμική υπομονάδα 30S και τον σχηματισμό ενός *συμπλόκου εκκίνησης 30S*, το οποίο αποτελείται από:

- ✓ την υπομονάδα 30S,
- ✓ το mRNA,
- ✓ το tRNA της φορμυλομεθειονίνης, και
- ✓ παράγοντες εκκίνησης (IF-1, 2, 3).

Οι παράγοντες εκκίνησης απαντώνται μόνο στις υπομονάδες 30S και αποδεσμεύονται όταν οι υπομονάδες 30S συνδέονται με τις υπομονάδες 50S για να σχηματιστεί το *σύμπλοκο έναρξης 70S* [11]. Συγκεκριμένα, οι λειτουργίες των τριών παραγόντων εκκίνησης είναι οι εξής:

- ✿ ο IF-3 είναι απαραίτητος για τη σταθεροποίηση των ελεύθερων υπομονάδων 30S και για την ειδική πρόσδεση αυτών στις θέσεις έναρξης στο mRNA.
 - ✿ ο IF-2 έχει δράση GTPάσης και προσδένεται στο ειδικό έναρκτήριο tRNA ελέγχοντας τη σύνδεσή του στο ριβόσωμα. Η τριφωσφορική γουανοσίνη υδρολύεται όταν συνδέεται η υπομονάδα 50S.
 - ✿ ο IF-1 προσδένεται στη θέση A και εμποδίζει την είσοδο AA-tRNA [15].
- Αξίζει να σημειωθεί πως από το σύμπλοκο εκκίνησης απελευθερώνεται ο IF-3, ώστε να επιτραπεί η πρόσδεση μιας υπομονάδας 50S και να σχηματιστεί τελικά ένα ενεργό ριβόσωμα 70S (εικόνα 2).



Εικόνα 2: Έναρξη της μετάφρασης στα προκαρυωτικά κύτταρα. Οι παράγοντες έναρξης βοηθούν τη συναρμολόγηση αρχικά του συμπλόκου έναρξης 30S και στη συνέχεια του συμπλόκου έναρξης 70S.

Ακριβώς πριν από το κωδικόνιο εκκίνησης στο mRNA βρίσκεται μια αλληλουχία μήκους 3 έως 9 νουκλεοτιδίων (η αποκαλούμενη **αλληλουχία Shine-Dalgarno**), η οποία συμμετέχει στη δέσμευση του mRNA στο ριβόσωμα. Αυτή η θέση δέσμευσης του ριβοσώματος στο 5' άκρο του mRNA είναι συμπληρωματική προς το 3' άκρο του 16S RNA του ριβοσώματος· η εν λόγω ζεύξη βάσεων είναι αυτή που διασφαλίζει τον σχηματισμό του συμπλόκου μεταξύ ριβοσώματος και mRNA. Η παρουσία της αλληλουχίας Shine-Dalgarno στο mRNA και η εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή της με το 16S rRNA επιτρέπουν στα προκαρυωτικά ριβοσώματα να χρησιμοποιούν τα πολυκιστρονικά mRNA, επειδή το ριβόσωμα μπορεί να βρίσκει τη θέση εκκίνησης

της μετάφρασης στο εσωτερικό κάθε μηνύματος [16], αφού κάθε κωδική περιοχή ενός πολυκιστρονικού mRNA αρχίζει με μια θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος [15].

Το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται μέσα στο τμήμα της θέσης P που φέρεται από τη μικρή υπομονάδα [15]. Η εκκίνηση αρχίζει πάντα με ένα ειδικό εναρκτήριο AA-tRNA, που δεσμεύεται στο **κωδικόνιο έναρξης**, το AUG και το οποίο έχει τη μοναδική ιδιότητα να εισέρχεται απευθείας στο τμήμα αυτό της θέσης P, προκειμένου να αναγνωρίσει το κωδικόνιό του [11,15]. Η αλληλεπίδραση αυτή θέτει το πλαίσιο ανάγνωσης. Στα *Βακτήρια*, το ειδικό αυτό μόριο είναι το tRNA της **φορμυλομεθειονίνης** [11]. Στη συνέχεια, η φορμυλομάδα απομακρύνεται από το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου, επομένως το ακραίο αμινοξύ μιας ολοκληρωμένης πρωτεΐνης είναι πάντοτε μια μεθειονίνη. Επειδή η αλληλουχία Shine-Dalgarno (όπως ίσως και άλλες θέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των rRNA και mRNA) εμπλέκεται και στην καθοδήγηση του ριβοσώματος προς μια θέση έναρξης, τα προκαρυωτικά μηνύματα χρησιμοποιούν ορισμένες φορές και άλλα κωδικόνια, πλην του AUG, ως κωδικόνια έναρξης. Το πλέον σύνηθες εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης είναι το GUG. Εν τούτοις, όταν το GUG χρησιμοποιείται με αυτόν τον ασυνήθιστο τρόπο, καθορίζει τη δέσμευση του tRNA της φορμυλομεθειονίνης (και όχι της βαλίνης) [16]. Δηλαδή το νόημα των κωδικονίων AUG και GUG εξαρτάται από το πλαίσιό τους. Όταν το κωδικόνιο AUG χρησιμοποιείται για την έναρξη, ερμηνεύεται ως φορμυλο-μεθειονίνη, ενώ όταν απαντάται μέσα στην κωδική περιοχή αντιστοιχεί σε μεθειονίνη. Το νόημα του κωδικονίου GUG εξαρτάται κυρίως από τη θέση του. Όταν υφίσταται ως πρώτο κωδικόνιο, διαβάζεται μέσω της αντίδρασης έναρξης ως φορμυλο-μεθειονίνη. Εντούτοις, όταν βρίσκεται εσωτερικά, διαβάζεται από το Val-tRNA, το οποίο παρέχει τη βαλίνη, όπως ορίζεται από το γενετικό κώδικα [15].

2.3 Επιμήκυνση

Η δεύτερη φάση της σύνθεσης πρωτεϊνών είναι ο κύκλος της επιμήκυνσης. Η φάση αυτή αρχίζει με την εισαγωγή ενός AA-tRNA στην άδεια θέση A του ριβοσώματος ανάλογα με το κωδικόνιο του mRNA που βρίσκεται στη θέση αυτή. Το σχετικό AA-tRNA δεν αφήνει απλώς τη συνθετάση και διαχέεται στη θέση A, αλλά παραδίδεται στη συγκεκριμένη θέση σε συνδυασμό με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται *παράγοντας επιμήκυνσης Tu* (EF-Tu). Ο συγκεκριμένος παράγοντας δεσμεύει AA-tRNA μόνο στη μορφή GTP.

Η δέσμευση του EF-Tu σε AA-tRNA εξυπηρετεί δυο λειτουργίες:

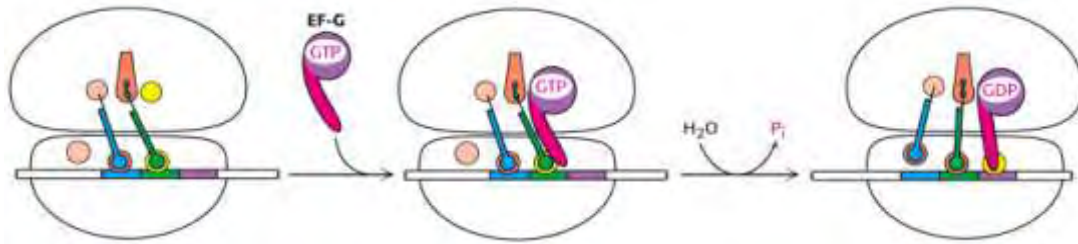
- ☀ Προστατεύει την εύθραυστη εστερική σύνδεση στο AA-tRNA από υδρόλυση

☀ Η GTP μέσα στον EF-Tu υδρολύεται προς GDP όταν έχει σχηματιστεί ένα κατάλληλο σύμπλοκο μεταξύ του συμπλόκου EF-Tu-AA-tRNA και του ριβοσώματος. Εάν το αντικωδικόνιο δεν είναι κατάλληλα ζευγαρωμένο με το κωδικόνιο, δεν πραγματοποιείται υδρόλυση και το AA-tRNA δεν μεταφέρεται στο ριβόσωμα. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει στην ελεύθερη ενέργεια από την υδρόλυση της GTP να συνεισφέρει στην πιστότητα της μετάφρασης.

Ο EF-Tu, όμως, πρέπει να ανακτήσει την αρχική του μορφή, ώστε να μπορεί να δεσμεύσει ένα άλλο AA-tRNA. Αυτό επιτυγχάνεται χάρη σε έναν δεύτερο παράγοντα επιμήκυνσης, τον παράγοντα επιμήκυνσης Ts, ο οποίος επάγει την αποσύνδεση της GDP. Στο τέλος η GTP δεσμεύεται στον EF-Tu και ταυτόχρονα απελευθερώνεται ο EF-Ts. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο EF-Tu δεν αλληλεπιδρά με fMet-tRNA_f. Επομένως, αυτό το εναρκτήριο tRNA δεν παραδίδεται στη θέση A. Αντίθετα, το Met-tRNA_m, όπως όλα τα άλλα tRNA, δεσμεύονται στον EF-Tu. Αυτές οι ανακαλύψεις αποτελούν εξήγηση του γεγονότος ότι εσωτερικά κωδικόνια AUG δεν διαβάζονται από το εναρκτήριο tRNA. Αντιστρόφως, ο παράγοντας έναρξης 2 αναγνωρίζει το fMet-tRNA_f αλλά κανένα άλλο tRNA [11].

Μετά την τοποθέτηση του σωστού AA-tRNA στη θέση A, η μεταφορά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το tRNA της θέσης P είναι μια αυθόρμητη διεργασία, η οποία ωθείται από τον σχηματισμό ενός ενεργειακά ισχυρότερου πεπτιδικού δεσμού στη θέση ενός εστερικού δεσμού. Ωστόσο, προκειμένου να συνεχιστεί η σύνθεση πρωτεϊνών, πρέπει να μετατοπιστεί το mRNA και τα tRNA μέσα στο ριβόσωμα. Συγκεκριμένα, το mRNA πρέπει να μετακινηθεί σε μια απόσταση τριών νουκλεοτιδίων καθώς το αποακυλιωμένο tRNA εγκαταλείπει τη θέση P και μετακινείται στη θέση E της υπομονάδας 30S, ενώ το πεπτιδυλο-tRNA εγκαταλείπει τη θέση A και μετακινείται στη θέση P στην υπομονάδα 30S, με αποτέλεσμα το επόμενο κωδικόνιο να τοποθετείται στη θέση A για να αλληλεπιδράσει με το εισερχόμενο tRNA.

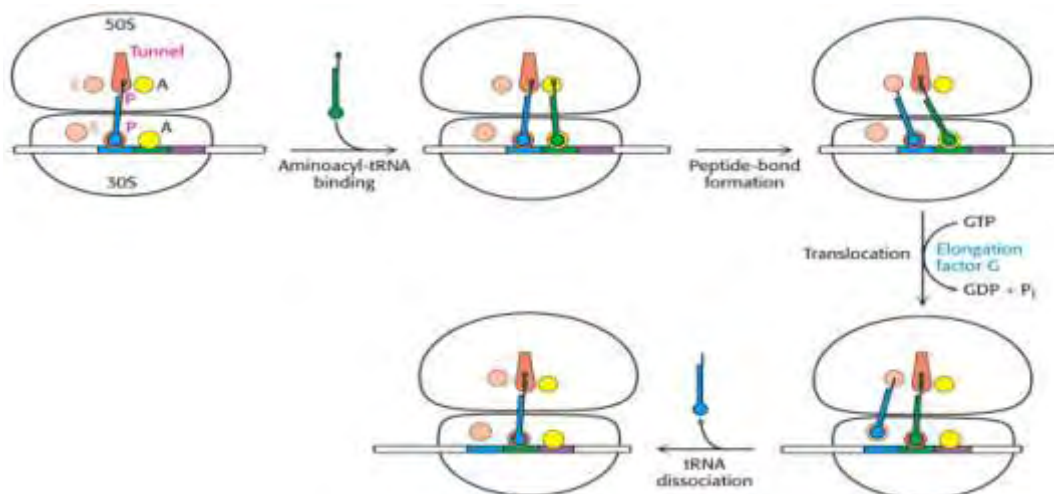
Η μετατόπιση διεκπεραιώνεται από τον παράγοντα επιμήκυνσης G (EF-G· ονομάζεται και *μετατοπάση*), η δέσμευση του οποίου στο ριβόσωμα διεγείρει τη δράση της GTPάσης του. Με την υδρόλυση GTP, ο EF-G υφίσταται αλλαγή της στερεοδιάταξής του η οποία ωθεί τον βραχίονά του βαθύτερα μέσα στη θέση A της υπομονάδας 30S. Για να χωρέσει αυτή η δομική περιοχή, το πεπτιδυλο-tRNA της θέσης A μετακινείται στη θέση P, μεταφέροντας μαζί του το mRNA και το αποακυλιωμένο tRNA. Το ριβόσωμα μπορεί επίσης να είναι προετοιμασμένο για τις ανακατατάξεις αυτές από την αρχική δέσμευση του παράγοντα EF-G. Η αποδέσμευση του EF-G αφήνει το ριβόσωμα έτοιμο να δεχθεί το επόμενο AA-tRNA μέσα στη θέση A (εικόνα 3) [11].



Εικόνα 3: Μηχανισμός μετατόπισης. Ο EF-G με τη μορφή GTP δεσμεύεται στη θέση δέσμευσης του EF-Tu στην υπομονάδα 50S. Αυτό προκαλεί την υδρόλυση της GTP, η οποία επάγει μια αλλαγή της στερεοδιάταξης του EF-G στη θέση A της υπομονάδας 30S. Για να χωρέσει αυτή η δομική περιοχή, τα tRNA και mRNA μετακινούνται διά μέσου του ριβοσώματος σε μια απόσταση που αντιστοιχεί σε ένα κωδικίο.

2.4 Τερματισμός

Ο τερματισμός συντελείται όταν το ριβόσωμα αφιχθεί σε κάποιο κωδικόνιο τερματισμού [16]. Συγκεκριμένα, το AA-tRNA κανονικά δεν δεσμεύεται στη θέση A του ριβοσώματος εάν το κωδικόνιο είναι UAA, UGA ή UAG, διότι φυσιολογικά κύτταρα δεν περιέχουν tRNA με αντικωδικόνια συμπληρωματικά σε αυτά τα σήματα τερματισμού. Αντίθετα, αυτά τα κωδικόνια αναγνωρίζονται από παράγοντες τερματισμού (RF1, RF2, RF3), πρωτεΐνες οι οποίες προκαλούν λύση του εστερικού δεσμού μεταξύ του πολυπεπτιδίου και του tRNA. Η αποσυνδεδεμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα αφήνει το ριβόσωμα. Το μεταφορικό και αγγελιοφόρο RNA παραμένουν για λίγο προσαρτημένα στο ριβόσωμα 70S μέχρις ότου το συνολικό σύμπλοκο αποσυναρμολογηθεί κατά έναν τρόπο που εξαρτάται από τον ριβοσωμικό παράγοντα τερματισμού (RRF) και τον EF-G (εικόνα 4) [11].



Εικόνα 4: Μηχανισμός σύνθεσης πρωτεϊνών. Ο κύκλος αρχίζει με το πεπτιδυλο-tRNA στη θέση P. Ένα αμινοακυλο-tRNA δεσμεύεται στη θέση A. Με τις δύο αυτές θέσεις κατειλημμένες, σχηματίζεται ένας νέος πεπτιδικός δεσμός. Τα tRNA και mRNA με τη δράση

του παράγοντα επιμήκυνσης G, ο οποίος μετακινεί το αποακυλιωμένο tRNA στη θέση E. Μόλις βρεθεί εκεί, είναι ελεύθερο να αποδεσμευθεί και να συμπληρωθεί ο κύκλος.

Μετά το πέρας της μεταφραστικής διαδικασίας, το ριβόσωμα απελευθερώνεται και δίσταται πάλι σε δύο υπομονάδες των 30S και 50S [11].

3. Αντιβιοτικά

Για την *in vivo* αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων χρησιμοποιούνται ποικίλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, τόσο συνθετικής όσο και φυσικής προελεύσεως. Οι ενώσεις αυτές έφεραν επανάσταση στην αντιμετώπιση των μικροβιακών λοιμώξεων και διαιρούνται ανάλογα με την προέλευσή τους (εικόνα 6) σε:

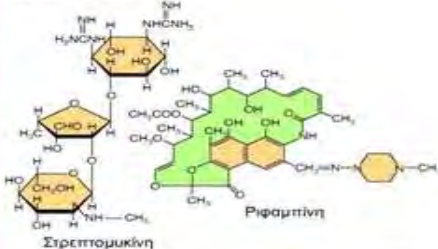
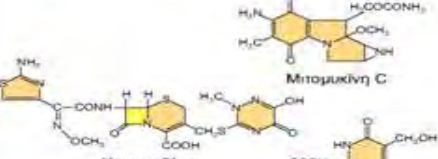
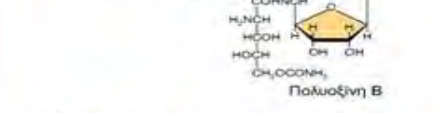
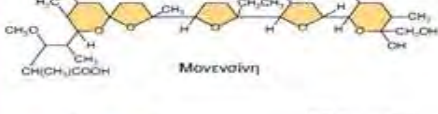
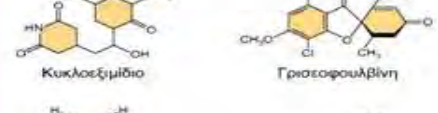


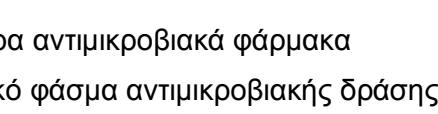
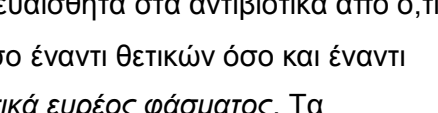
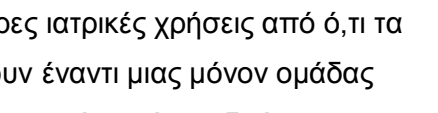
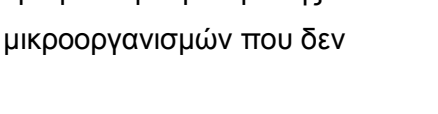
- ✓ παραπροϊόντα μικροοργανισμών (αντιβιοτικά)
- ✓ εξ' ολοκλήρου εργαστηριακές συνθέσεις (συνθετικά φάρμακα)
- ✓ συνδυασμός των δύο πιο πάνω κατηγοριών (ημισυνθετικά φάρμακα)

Στην πράξη, ο όρος αντιβιοτικό έχει γίνει συνώνυμος με τον όρο αντιμικροβιακό φάρμακο και αυτός ο γενικότερος ορισμός του αντιβιοτικού θα χρησιμοποιείται στο κείμενο [17,18].

Τα αντιβιοτικά διαιρούνται σε δύο κατηγορίες, τα βακτηριοστατικά και τα βακτηριοκτόνα. Βακτηριοκτόνα ονομάζονται όταν οι συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν στο αίμα υπερβαίνουν συνήθως την ελάχιστη βακτηριοκτόνος πυκνότητα (ΕΒΠ) για τα πιο κοινά παθογόνα, ενώ βακτηριοστατικά όταν οι συγκεντρώσεις στο αίμα υπερβαίνουν την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα (ΕΑΠ), αλλά είναι συνήθως μικρότερες από την ΕΒΠ. Όμως η διάκριση των αντιβιοτικών σε κατηγορίες ανάλογα με το αν υπερισχύει η βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος δράση δεν είναι απόλυτα σωστή, γιατί η σχέση κάθε βακτηρίου και κάθε αντιβιοτικού είναι διαφορετική. Για παράδειγμα η πενικιλίνη, που θεωρείται βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό, είναι σχεδόν πάντα βακτηριοκτόνος κατά των στρεπτόκοκκων, αλλά βακτηριοστατική κατά των εντερόκοκκων [17].

Οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες ταξινομούνται επιπλέον βάσει της δομής τους (πίνακας 1), καθώς και του τρόπου δράσης τους (εικόνα 5) [16].

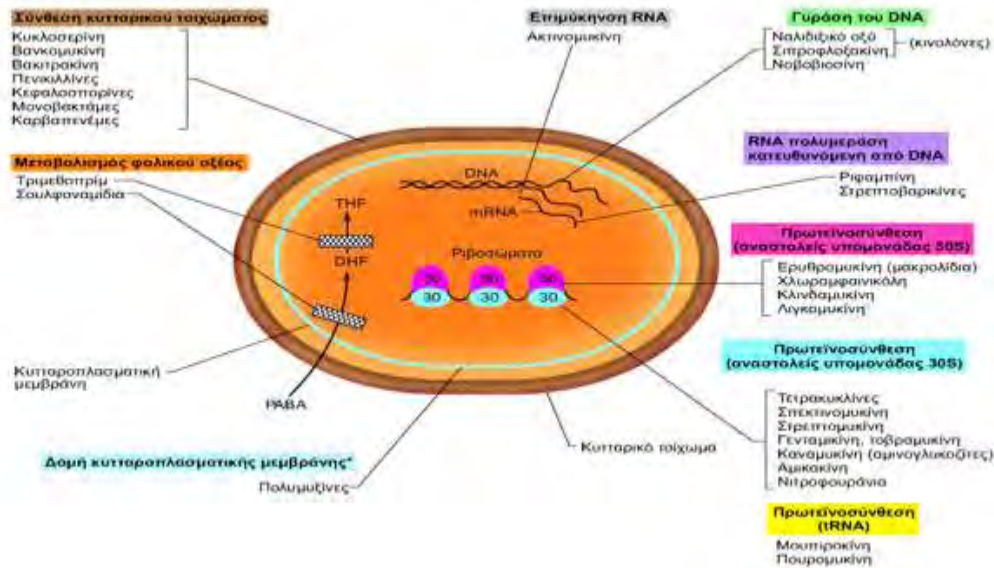
Πίνακας 1: Ταξινόμηση αντιβακτηριακών χημειοθεραπευτικών παραγόντων βάσει της χημικής δομής τους. Δίνεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για κάθε κατηγορία.

Κατηγορία αντιβιοτικού	Υποκατηγορία	Παράδειγμα	Χαρακτηριστική δομή
I. Ενώσεις που περιέχουν υδατάνθρακες	Καθάρη σάκχαρα Αμινογλυκοζίδες Ορθοσομικίνες N-Γλυκοζίδες C-Γλυκοζίδες Γλυκολιπίδια	Νοζιμικίνη Στρεπτομικίνη Εβερνινομικίνη Στρεπτοθαδικίνη Βανκομικίνη Μοenoμικίνη	 Στρεπτομικίνη
II. Μακροκυκλικές λακτόνες	Μακρολιδικά αντιβιοτικά Αντιβιοτικά πολυενίου Ανοσομικίνες Μακροετρολιδια	Ερυθρομικίνη Κανδιδαμίνη Ριφαμπίνη Τετρανακτίνη	 Ριφαμπίνη
III. Κινονές και συναφείς ενώσεις	Τετρακυκλίνες Ανθρακυκλίνες Ναφθοκινόνες Βενζοκινόνες	Τετρακυκλίνη Αδριαμικίνη Ακτινοροδίνη Μιτομικίνη	 Μιτομικίνη C
IV. Ανάλογα αμινοξέων και πεπτιδίων	Παράγωγα αμινοξέων Αντιβιοτικά β-λακτάμης Πεπτιδικά αντιβιοτικά Χρωμοπεπτιδια Δεσμηπεπτιδια Χηλοκοιτητικά πεπτιδια	Κυκλοσερίνη Πενικιλίνη κεφτριαζόνη Βακτηρικίνη Ακτινομικίνη Βαλινομικίνη Βλεομικίνη	 Κεφτριαζόνη
V. Ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο	Νουκλεοζιδικά αντιβιοτικά	Πολυοξίνες	 Πολυοξίνη B
VI. Ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο	Αντιβιοτικά πολυαιθέρα	Μονενσίνη	 Μονενσίνη
VII. Αλικυκλικά παράγωγα	Παράγωγα κυκλοαλκανίων Στεροειδή αντιβιοτικά	Κυκλοεξιμίδιο Φουσιδικό οξύ	 Κυκλοεξιμίδιο
VIII. Αρωματικές ενώσεις	Παράγωγα βενζόλιου Συμπυκνωμένα αρωματικά Αρωματικός αιθέρας	Χλωραμφαινικόλη Γκρισοφουλβίνη Νοβοβοσίνη	 Κυκλοεξιμίδιο
IX. Αλειφατικές ενώσεις	Ενώσεις που περιέχουν φωσφόρο	Φωσφομικίνη	 Φωσφομικίνη
X. Ενώσεις της κινολόνης	4-Κινολόνη Φθόρο-4-κινολόνη	Ναλιδικό οξύ Σπρροφλαζακίνη	 Ναλιδικό οξύ
XI. Οξαζολιδιόνη	Κυκλική λακτόνη	2-Οξαζολιδιόνη	 2-Οξαζολιδιόνη

3.1 Μηχανισμός δράσης

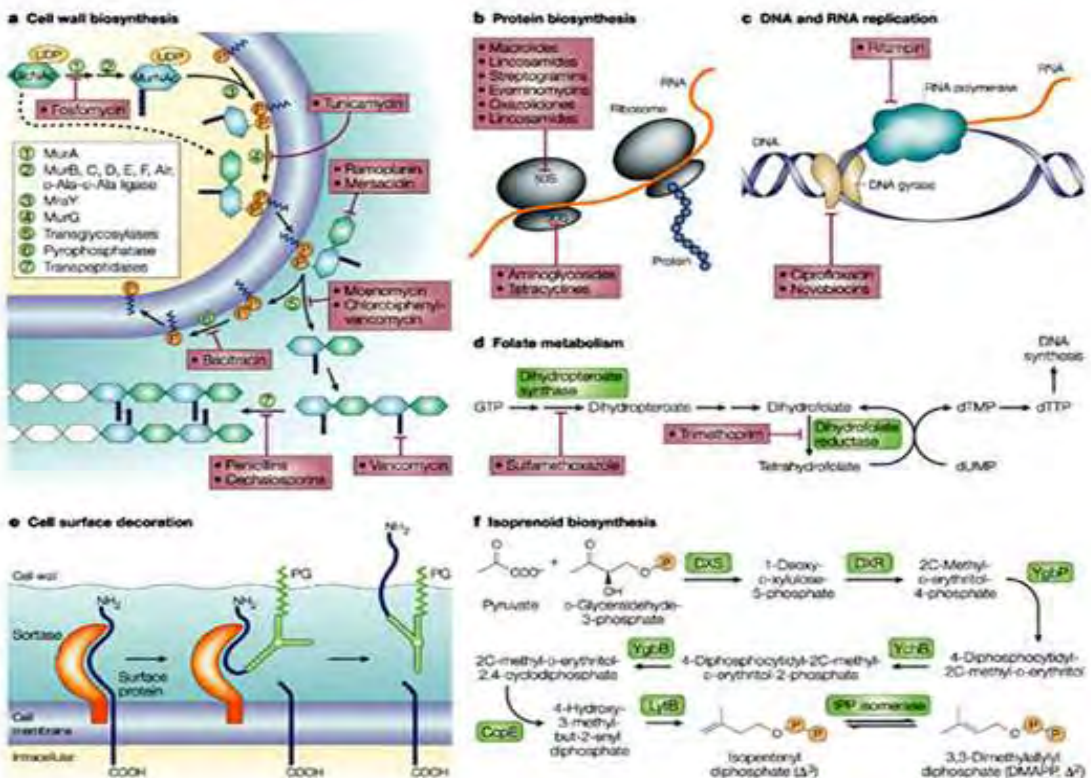
Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα ποικίλλει. Κάθε παράγοντας έχει ένα χαρακτηριστικό φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Τα θετικά κατά Gram *Βακτήρια* είναι συνήθως πιο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά από ό,τι τα αρνητικά κατά Gram. Αντιβιοτικά που δρουν τόσο έναντι θετικών όσο και έναντι αρνητικών κατά Gram *Βακτηρίων* λέγονται *αντιβιοτικά ευρέος φάσματος*. Τα αντιβιοτικά ευρέως φάσματος βρίσκουν περισσότερες ιατρικές χρήσεις από ό,τι τα *αντιβιοτικά περιορισμένου φάσματος*, τα οποία δρουν έναντι μιας μόνον ομάδας μικροοργανισμών. Ωστόσο, ένα αντιβιοτικό με περιορισμένο φάσμα δράσης ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τον έλεγχο μικροοργανισμών που δεν ανταποκρίνονται σε άλλα αντιβιοτικά.

Στα βακτήρια, σημαντικότεροι στόχοι της αντιβιοτικής δράσης είναι το κυτταρικό τοίχωμα (π.χ. βανκομυκίνη), η κυτταροπλασματική μεμβράνη (π.χ. πολυμυξίνες), η σύνθεση – ακεραιότητα του DNA (π.χ. κινολόνες), καθώς και οι βιολογικές διεργασίες της μεταγραφής και μετάφρασης (π.χ. μακρολίδια, τετρακυκλίνες, ριφαμπίνη) [16,18].



Εικόνα 5: Τρόπος δράσης των σημαντικότερων αντιβιοτικών

Τα στάδια που αναστέλλονται σε κάθε βιοχημική διεργασία παρουσιάζονται λεπτομερώς στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Απεικονίζονται λεπτομερώς οι κύριοι βιοχημικοί στόχοι των αντιβιοτικών. Στις εικόνες a-f απεικονίζονται τα βιοχημικά μονοπάτια που είναι ή έχουν προταθεί να είναι οι στόχοι των αντιβιοτικών [3].

3.2 Αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση

Θεμελιώδεις βιοχημικές διαφορές μεταξύ βακτηρίων και ανθρώπου αξιοποιούνται στον σχεδιασμό αυτών των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Το ιδανικό αντιβιοτικό παρεμβαίνει σε κάποια ζωτική λειτουργία των βακτηρίων, χωρίς να επηρεάζει τα κύτταρα του ξενιστή κι αυτό είναι εφικτό λόγω των διαφορών που υπάρχουν μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών ριβοσωμάτων. Συγκεκριμένα, το βακτηριακό ριβόσωμα (70S) είναι αρκετά διαφορετικό από τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα (80S), έτσι ώστε σημεία του να αποτελούν καλούς στόχους για τα αντιμικροβιακά φάρμακα.

Όσον αφορά τα αντιβιοτικά που επηρεάζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, πρόκειται για μία αρκετά ετερογενή ομάδα φαρμάκων [17]. Αν και οι ριβοσωματικές πρωτεΐνες μπορούν να επηρεάσουν την πρόσδεση και τη δράση αυτών των αντιβιοτικών, πρωταρχικός τους στόχος είναι το rRNA [1].

Αρκετές κατηγορίες αντιβιοτικών αναστέλλουν τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση λόγω της σημασίας που κατέχει αυτή μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον, το ριβόσωμα ανήκει στους πιο πολύπλοκους κυτταρικούς σχηματισμούς προσφέροντας έτσι πολλά υποψήφια σημεία παρέμβασης.

Επειδή τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες διαθέτουν ριβοσώματα προκαρυωτικού τύπου (70S), τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση των *Βακτηρίων* θα πρέπει να αναστέλλουν και την πρωτεϊνοσύνθεση αυτών των οργανιδίων. Σε αυτό ακριβώς το σημείο έγκειται η ιατρική αξία ορισμένων αντιβιοτικών, όπως της τετρακυκλίνης, η οποία στις συνήθεις θεραπευτικές δόσεις αφήνει ανεπηρέαστα τα ευκαρυωτικά μιτοχόνδρια [16,17].

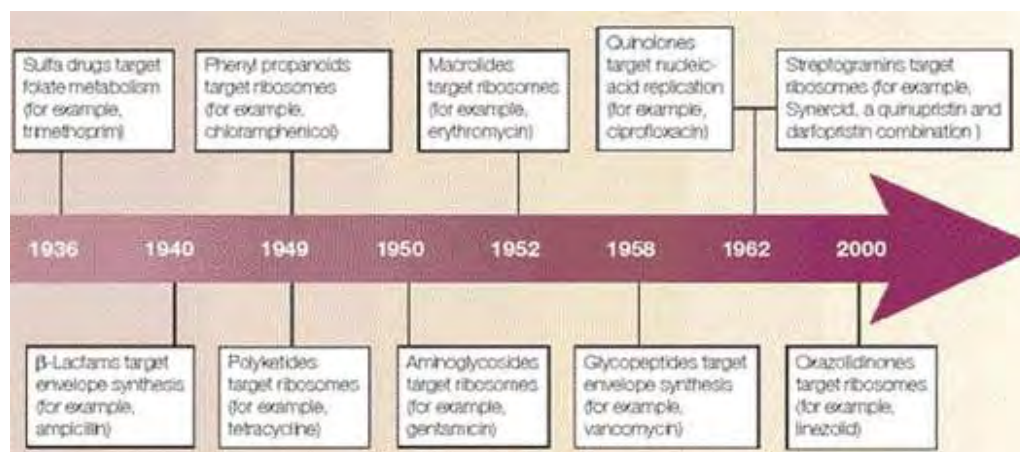
Στις τελευταίες τρεις δεκαετίες μόνο μία πραγματικά καινούρια κατηγορία αντιβιοτικών εισήχθη στην ιατρική φροντίδα, οι οξαζολιδιόνες, με το λινεζολίδιο ως το κυρίαρχο μέλος, στόχος του οποίου είναι η πρωτεϊνοσύνθεση [19].

Στην περίπτωση των αναστολέων της πρωτεϊνικής σύνθεσης ισχύουν τα εξής:

- ✓ Ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: αναστολείς της 30S υπομονάδας, αναστολείς της 50S υπομονάδας και αναστολείς του 70S ριβοσώματος [2].
- ✓ Είναι εκλεκτικοί, αν και εκτός από τα βακτηριακά ριβοσώματα μπορεί να επιδράσουν αρνητικά και στα ριβοσώματα του ανθρώπου είτε τα μιτοχονδριακά είτε τα κυτοσολικά είτε και στα δυο συγχρόνως. Η αναστολή των ριβοσωμάτων του ξενιστή είναι ένας συνήθης μηχανισμός μέσω του οποίου προκαλούν αυτά τα

φάρμακα παρενέργειες. Αυτό δεν ισχύει για όλα τα αντιβιοτικά, καθώς υπάρχουν και αντιβιοτικά που προκαλούν ελάχιστη ή και καθόλου αναστολή των ριβοσωμάτων του ξενιστή στις κλινικά χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις. Για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, η τοξικότητα φαίνεται να αποδίδεται σε άλλους μηχανισμούς. Όπως ισχύει για τα περισσότερα σκευάσματα που χορηγούνται διά της στοματικής οδού, προκαλούνται γαστρεντερολογικές παρενέργειες που οφείλονται στην ελάττωση της ενδογενούς χλωρίδας.

- ✓ Πλήρης αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης δεν είναι αρκετή για να σκοτώσει ένα βακτήριο, καθώς τα βακτήρια με διάφορους μηχανισμούς που έχουν αναπτύξει μπορούν και επιβιώνουν μέχρις ότου απομακρυνθεί η θεραπεία, με συνέπεια οι περισσότεροι αναστολείς να είναι βακτηριοστατικοί εκτός από τις αμινογλυκοσίδες που αποτελούν εξαίρεση του κανόνα [18].

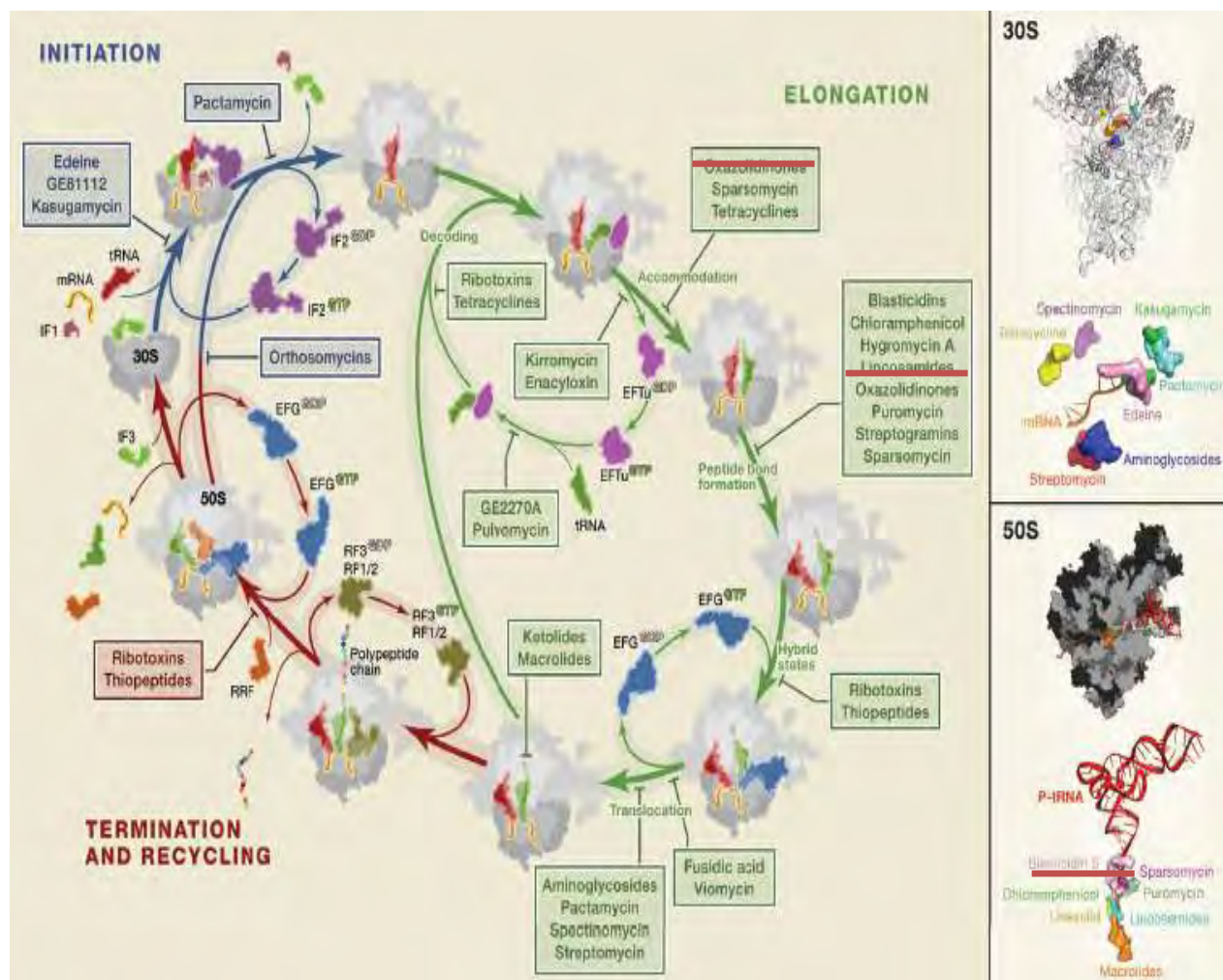


Εικόνα 7: Σχεδιάγραμμα εισαγωγής στην κλινική πράξη διάφορων αντιβιοτικών [3].

Τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά στοχεύουν ορισμένα χαρακτηριστικά των ριβοσωμάτων και αυτά είναι το κέντρο αποκωδικοποίησης, το κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς, η σήραγγα εξόδου και ορισμένα κινητά στοιχεία που παρέχουν τη δυναμική που απαιτείται στο ριβόσωμα για την πρωτεϊνοσύνθεση. Συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών που ως στόχο τους έχουν τα ριβοσώματα (εικόνα 8) περιλαμβάνουν:

- ✿ συναγωνισμό κατά την πρόσδεση του υποστρώματος
- ✿ παρεμβολή στη δυναμική του ριβοσώματος
- ✿ ελαχιστοποίηση της κινητικότητας του ριβοσώματος
- ✿ προαγωγή εσφαλμένης αποκωδικοποίησης
- ✿ παρεμπόδιση της ανάπτυξης της αλυσίδας του mRNA
- ✿ φραγή της προόδου της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης
- ✿ διαταραχή της αρχιτεκτονικής των ενεργών κέντρων του ριβοσώματος [13,20,21].

Κάποια από τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας έχουν κλινική χρησιμότητα, ενώ άλλα συνιστούν χρήσιμα ερευνητικά εργαλεία, διότι παρεμβαίνουν μόνο σε συγκεκριμένα στάδια της πρωτεϊνσύνθεσης. Όμως, ακόμη κι όταν δύο αντιβιοτικά αναστέλλουν το ίδιο στάδιο της πρωτεϊνσύνθεσης, μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ως προς τον τρόπο δράσης τους. Για παράδειγμα, η πουρομυκίνη δεσμεύεται στη θέση A του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα η επιμηκνόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα να μεταφέρεται στην πουρομυκίνη αντί να μεταφέρεται στο σύμπλοκο αμινοξέος-tRNA. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο πουρομυκίνης-πεπτιδίου απελευθερώνεται από το ριβόσωμα, τερματίζοντας πρόωρα την επιμήκυνση. Η χλωραμφαινικόλη, από την άλλη πλευρά, αναστέλλει επίσης την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλά αυτό οφείλεται στο ότι παρεμποδίζει τον σχηματισμό των πεπτιδικών δεσμών [16].



Εικόνα 8: Απεικόνιση των αντιβιοτικών που δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης σε κάθε στάδιο της διαδικασίας [21].

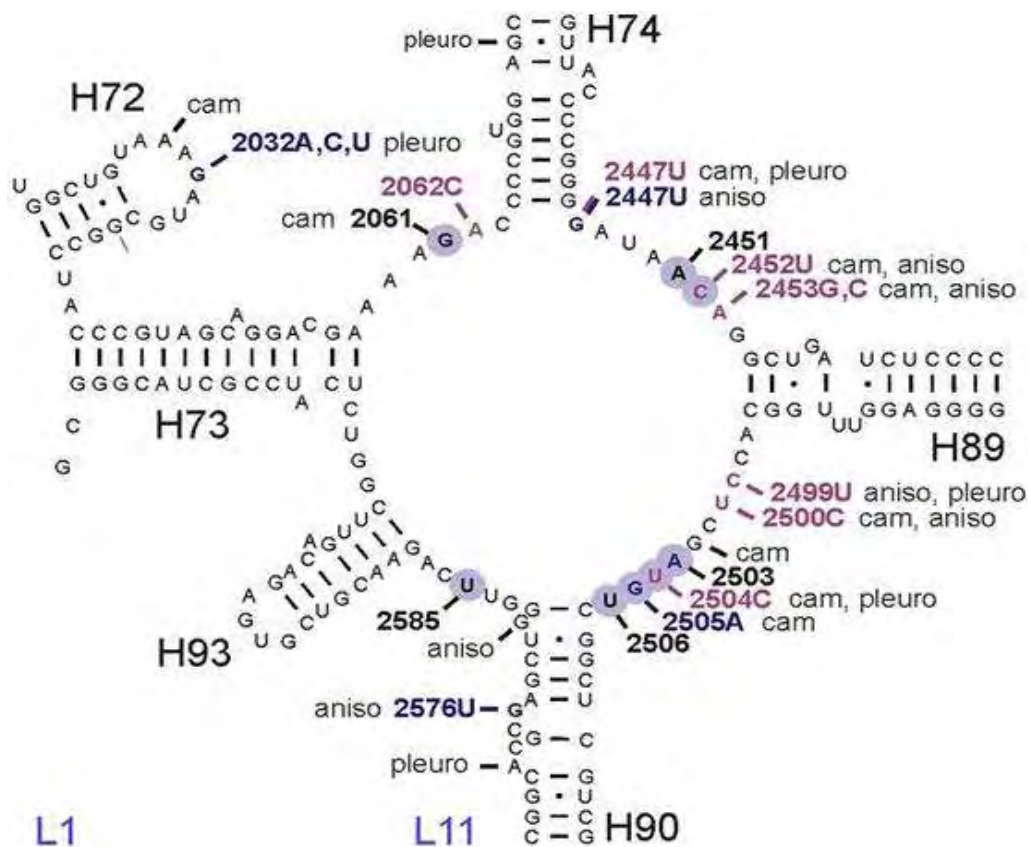
4. Οξαζολιδινόνες

Οι πρώτες οξαζολιδινόνες αναπτύχθηκαν από την El DuPont de Nemours & Co. Inc. το 1978 και συντέθηκαν εξαιτίας της δραστικότητάς τους έναντι συγκεκριμένων παθογόνων των φυτών. Μετά από εννιά χρόνια, το 1987, δύο αντιβακτηριδιακές οξαζολιδινόνες, οι DuP 721 και DuP 105, συντέθηκαν ως αντιβακτηριδιακά κατά παθογόνων του ανθρώπου. Παρόλα αυτά λόγω της τοξικότητάς τους, η περαιτέρω ανάπτυξή τους σταμάτησε. Στη συνέχεια, τα εργαστήρια Upjohn (αργότερα Pharmacia και τώρα Pfizer) συνέχισαν να μελετούν τις οξαζολιδινόνες και το 1996 συντέθηκαν δύο μη τοξικά παράγωγα αυτών των φαρμάκων, ένα εκ των οποίων είναι το λινεζολίδιο που είναι παράγωγο της μορφολίνης [22].

Οι οξαζολιδινόνες αντιπροσωπεύουν την πρώτη ολοκληρωτικά νέα τάξη αντιβιοτικών με έναν καινούριο μηχανισμό δράσης που εγκρίθηκε μετά από 35 χρόνια περίπου, στις αρχές της δεκαετίας του 1960, όταν εγκρίθηκε το ναλιδιξικό οξύ (ο προγενήτορας των συνθετικών φλουοροκινολονών) [23]. Εμφανίζουν δραστικότητα έναντι σημαντικά ευαίσθητων αλλά και ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά (MDR) Gram-θετικών και πιο πρόσφατα Gram-αρνητικών παθογόνων. Συγκεκριμένα, οι οξαζολιδινόνες χρησιμοποιούνται για να θεραπεύσουν δερματικές και αναπνευστικές μολύνσεις οι οποίες προκαλούνται από στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Streptococci* και δρουν επίσης ενάντια σε ανθεκτικό στη βανκομυκίνη *Enterococcus faecium*. Αναλυτικά το αντιμικροβιακό φάσμα της μοναδικής οξαζολιδινόνης που κυκλοφορεί, της λινεζολίδης, παρουσιάζεται στην επόμενη παράγραφο.

Όσον αφορά τη θέση πρόσδεσης και τον μηχανισμό δράσης τους, έχουν προταθεί διάφορα σενάρια. Κοινώς αποδεκτή παρατήρηση είναι το γεγονός ότι αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [24]. *In vivo* διασύνδεση αποκάλυψε το κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς ως στόχο του φαρμάκου. Συγκεκριμένα, από πειράματα μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις οξαζολιδινόνες φαίνεται ξεκάθαρα ότι ο κεντρικός βρόγχος της επικράτειας V είναι η κύρια θέση με την οποία συνδέονται οι οξαζολιδινόνες (εικόνα 9) [10]. Σε αυτή την παρατήρηση συγκλίνουν κι άλλες μελέτες που αναφέρουν ότι η λινεζολίδη προσδένεται στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος και ότι η θέση πρόσδεσής της επικαλύπτεται με εκείνη της λινκομυκίνης και της χλωραμφενικόλης [24]. Άλλες μελέτες δείχνουν ότι οι οξαζολιδινόνες στοχεύουν τη θέση P του ριβοσώματος [25]. Παρόλα αυτά, οι οξαζολιδινόνες φαίνεται να έχουν έναν διαφορετικό μηχανισμό δράσης από τα άλλα αντιβιοτικά και αυτό επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι δεν

εμφανίζουν ανθεκτικότητα ταυτόχρονα με άλλα αντιβιοτικά [10,26,27]. Αν και η μετάφραση αναγνωρίζεται ως ο κύριος στόχος αυτής της κατηγορίας των αντιβιοτικών, παραμένει ακόμη ωστόσο διαφορούμενο το βήμα στο οποίο ασκούν την ανασταλτική τους δράση [28]. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι αναστέλλουν γεγονότα της μετάφρασης που κυμαίνονται από την έναρξη, τη συναρμολόγηση του συμπλόκου εκκίνησης 70S [29,30] και τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, την εξαρτώμενη από τον παράγοντα EF-G μετατόπιση κατά την επιμήκυνση [31] και μετατόπιση πλαισίου, μέχρι την μη νοηματική καταστολή κατά τον τερματισμό [7]. Η κεντρική περιοχή της επικράτειας V είναι η πιο σημαντική λειτουργικά περιοχή του ριβοσώματος. Η τελευταία μελέτη είναι σύμφωνη με την παρατήρηση ότι ανθεκτικότητα στα αρχαία και τα βακτήρια προκύπτει από μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων μέσα στο PTC, όπως φαίνεται και παρακάτω στην εικόνα.



Εικόνα 9: Δευτεροταγής δομή του δακτυλίου της πεπτιδυλομεταφοράσης του 23S rRNA από τον οργανισμό *D. radiodurans* με τις θέσεις μετάλλαξης στα βακτήρια (μπλε) και τα αρχαία (μωβ) που συνεπάγονται αντίσταση στις οξαζολιδιόνες όπως υποδεικνύεται σύμφωνα με αρίθμηση από *E. coli*.

Έχει αποδειχθεί ότι δεν αναστέλλουν τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού στο ριβόσωμα της *E. coli* [10], αλλά και σε κανένα άλλο σύστημα [29,32,33,]. Ειδικότερα,

πραγματοποιήθηκε έρευνα ειδικά για την πεπτιδυλομεταφοράση, ώστε να διασαφηνιστεί αν ανακόπτεται η λειτουργία της. Χρησιμοποιήθηκε φορμυλο-μεθειονυλο-tRNA ως δότης υποστρώματος και η πουρομυκίνη ως δέκτης, παρουσία 33% μεθανόλης. Ακόμα και σε συγκέντρωση 12.5 mM, η λινεζολίδη δεν επηρέασε την αντίδραση υποδεικνύοντας ότι η αντίδραση που καταλύεται από την πεπτιδυλομεταφοράση δεν είναι ο κύριος στόχος του φαρμάκου [10]. Συνεπώς, άμεσα δεν εμποδίζουν τη δράση της πεπτιδυλομεταφοράσης, αλλά πιθανόν έμμεσα να την επηρεάζουν αρνητικά [10].

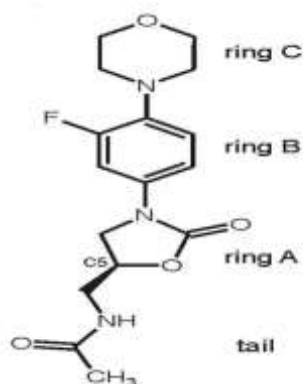
4.1 Λινεζολίδη

Η λινεζολίδη είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό το οποίο ανήκει σε μία καινούρια χημική τάξη αντιμικροβιακών παραγόντων, τις οξαζολιδινόνες [34]. Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των Gram-θετικών παθογόνων στα παραδοσιακά αντιβιοτικά οδήγησε στην ανάπτυξή του. Πρόκειται για το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αντιβιοτικό αυτής της κατηγορίας το οποίο πήρε έγκριση από τον FDA στις 17 Απριλίου του 2000 [35].

4.1.1 Χημεία

Η λινεζολίδη ή *N-[[[(S)-3-(3-φθορο-4-μορφολινοφαινυλο)-2-οξο-5-οξαζολιδινυλο]μεθυλο]ακεταμίδη* είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό που ανήκει στην τάξη των οξαζολιδινονών και δεν σχετίζεται δομικά με κανένα άλλο αντιβιοτικό [36].

Η λινεζολίδη αποτελείται από τέσσερα τμήματα, τρεις δακτυλίους και μια ακεταμιδομεθυλική ουρά. Ο δακτύλιος-A αντιπροσωπεύει τον φαρμακοκινητικό δακτύλιο των οξαζολιδινονών από τον οποίο προέρχεται το όνομα αυτής της τάξης των αντιβιοτικών (εικόνα 10) [7].



Εικόνα 10: Η χημική δομή της λινεζολίδης.

4.1.2 Μηχανισμός δράσης

Το λινεζολίδιο αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση, καθώς προσδένεται άμεσα σε κατάλοιπα του 23S ριβοσωμικού RNA και συγκεκριμένα στην επικράτεια V της 50S υπομονάδας [37]. Αναλυτικότερα, το λινεζολίδιο φαίνεται ότι προσδένεται [38] και δρα συγκεκριμένα στη θέση-A της πεπτιδυλομεταφοράς, με σκοπό να εμποδίσει τον σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοακυλο-ομάδων των μεταφορικών RNAs που βρίσκονται στις θέσεις P και A. Συνεπώς, ο μηχανισμός δράσης του λινεζολιδίου φαίνεται ότι εμποδίζει τον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού παρά τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης (εικόνα 11). Το λινεζολίδιο έχει επίσης αναφερθεί ότι επηρεάζει αρνητικά την πιστότητα της μετάφρασης στα βακτήρια αφού προκαλεί μεταλλάξεις μετατόπισης του αναγνωστικού πλαισίου [39,40].



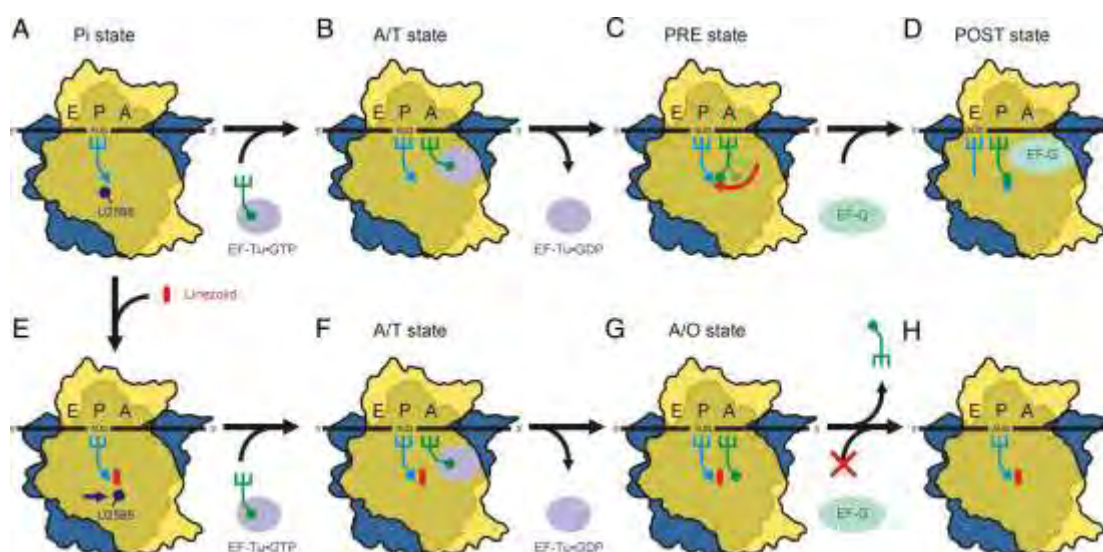
Εικόνα 11: Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς δράσης της λινεζολίδης. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι συνδέεται στη θέση A της πεπτιδυλομεταφοράς και εμποδίζει τον σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού μεταξύ του εναρκτήριου tRNA της θέσης P και του αμινοακυλο-tRNA της θέσης A εμποδίζοντας την επιμήκυνση της πρωτεΐνης.

Όσον αφορά το περιβάλλον με το οποίο αλληλεπιδρά το λινεζολίδιο, κάποια από τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά στοιχεία από τα οποία συνίσταται είναι:

- Οι κρίσιμες βάσεις του PTC 2504 μέχρι 2506 [41], με τις οποίες δημιουργεί την πλειοψηφία των επαφών [42]. Συγκεκριμένα, το κατάλοιπο U2504 σχηματίζει ένα σημαντικό τμήμα της θέσης πρόσδεσης της λινεζολίδης.
- Κατάλοιπα των πρωτεϊνών L3 και L4. Συγκεκριμένα, η L4 αλληλεπιδρά στενά με το PTC και μεταλλάξεις της συνδέονται με ανθεκτικότητα, επειδή διαταράσσουν τη δομή του 23S rRNA [42].

Η πρόσδεση του λινεζολιδίου σταθεροποιεί μια ευδιάκριτη δομή της καθολικά συντηρημένης νουκλεοβάσης U2585 του 23S rRNA σε έναν προσανατολισμό που είναι ευκρινώς διαφορετικός σε σύγκριση με όταν A και P-tRNAs είναι προσδεμένα, με αποτέλεσμα να επιφέρει μια μη παραγωγική διαμόρφωση -όσον αφορά το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού- του PTC [43,44].

Ένα προτεινόμενο μοντέλο για τον μηχανισμό δράσης του λινεζολιδίου είναι και το ακόλουθο:



Εικόνα 12: Ένα ακόμη μοντέλο για τον μηχανισμό δράσης των οξαζολιδινών κατά τη διάρκεια της μετάφρασης. Το μοντέλο δείχνει τα γεγονότα της μετάφρασης τόσο χωρίς την επίδραση του λινεζολιδίου (A-D), όσο και με την επίδρασή του (E-H). Η μικρή και η μεγάλη υπομονάδα απεικονίζονται με κίτρινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα [7].

4.1.3 Αντιμικροβιακό φάσμα δράσης

Όσον αφορά το φάσμα δράσης του, το λινεζολίδιο χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που οφείλονται σε Gram-θετικά παθογόνα ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, το λινεζολίδιο παρουσιάζει αξιοσημείωτη *in vitro* δραστικότητα έναντι των παρακάτω ειδών:

- ✓ ***S. aureus*** (MRSA, MSSA, CoNS): ένας μικροοργανισμός ο οποίος ευθύνεται για πολλές νοσοκομειακές λοιμώξεις. Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις του λινεζολιδίου ($MIC_{50/90S}$) ενάντια στον MRSA και MSSA είναι 1-2/2-4 mg/l, σε διαφορετικές μελέτες, ενάντια στελεχών που συλλέχθηκαν από διαφορετικές περιοχές του κόσμου. Το λινεζολίδιο έχει επίσης παρόμοια δραστικότητα ενάντια στον αρνητικό σε πηκτάση σταφυλόκοκκο, για τον οποίο η MIC_{50} s κυμαίνεται από 0.5-2 mg/l και η MIC_{90} s από 1-4 mg/l. Σε όλες αυτές τις μελέτες το 100% των στελεχών που εξετάστηκαν εμφάνισαν ευαισθησία στο κατώφλι των 4 mg/l και η δραστικότητα του φαρμάκου ενάντια στους σταφυλόκοκκους δεν επηρεάστηκε από την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη. Επιπλέον, στελέχη ενδιάμεσης ανθεκτικότητας στη βανκομυκίνη, καθώς επίσης και δύο στελέχη ανθεκτικά στη βανκομυκίνη (VRSAs) που απομονώθηκαν από το Michigan και το Hershey Medical Center, εμφάνισαν ευαισθησία στο λινεζολίδιο ($MIC = 1$ mg/l). Όταν η αποτελεσματικότητα του λινεζολιδίου συγκρίνεται με αυτή άλλων αντιμικροβιακών

που εξετάστηκαν στις προαναφερθείσες μελέτες, φαίνεται ότι η αποτελεσματικότητα του λινεζολιδίου είναι παρόμοια με αυτή της βανκομυκίνης, αλλά η κουνιπριστίνη/δαλφοπριστίνη έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενάντια και στις δύο ομάδες σταφυλόκοκκων.

- ✓ ***S. epidermidis***
- ✓ ***Streptococci***, groups A, B, C και G: συγκεκριμένα, το λινεζολίδιο είναι ενεργό ενάντια του *Streptococcus pneumoniae* για τη θεραπεία της νοσοκομειακής και της επίκτητης από την κοινότητα πνευμονίας άσχετα με την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε άλλα αντιμικροβιακά, όπως οι μακρολίδες, οι β-λακτάμες και οι κινολόνες.
- ✓ **Εντερόκοκκοι**: αν και έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα περισσότερα αντιβιοτικά, *in vitro* πειράματα δείχνουν ότι το λινεζολίδιο είναι αποτελεσματικό έναντι αυτών και συγκεκριμένα έχει MIC_{50/90} 1-2/2-4 mg/l, παρόμοια με αυτή εναντίον των σταφυλόκοκκων. Τα είδη *E. faecium* και *E. faecalis* που είναι ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένου και του στελέχους του ανθεκτικού στη βανκομυκίνη (VRE), έχουν τις ίδιες MICs -όσον αφορά το λινεζολίδιο- με τους οργανισμούς που εμφανίζουν ευαισθησία [22].
- ✓ **Gram-θετικών αναερόβιων βάκιλλων (rods) και κόκκων** [36,40,45]
- ✓ **Gram-αρνητικά βακτήρια** [28,46].

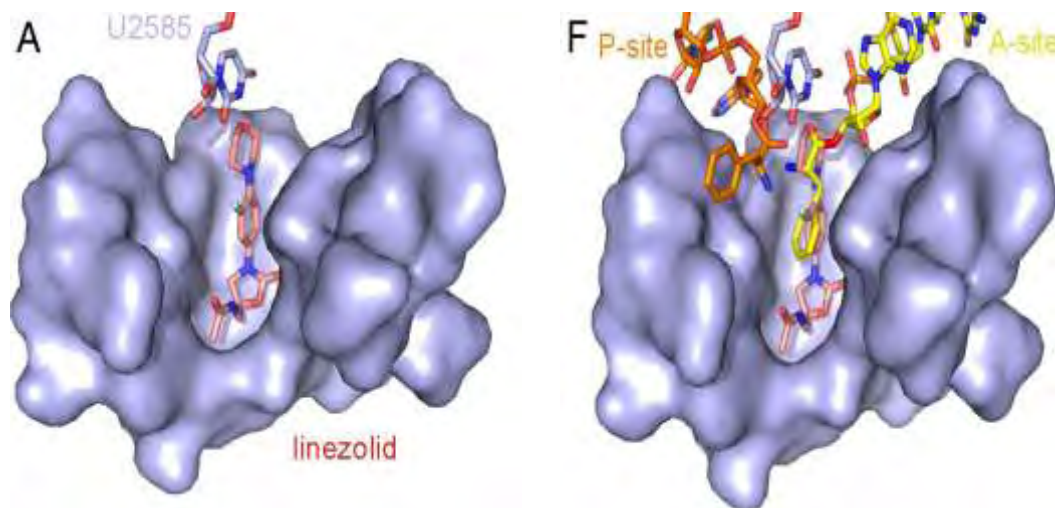
4.1.4 Το λινεζολίδιο στην κλινική χρήση

Το λινεζολίδιο έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία πολύπλοκων δερματικών μολύνσεων που προκαλούνται από τον MRSA, της νοσοκομειακής πνευμονίας που οφείλεται επίσης στον MRSA, της ταυτόχρονης βακτηριαιμίας που σχετίζεται με τον ανθεκτικό στη βανκομυκίνη *E. faecium* και της ταυτόχρονης βακτηριαιμίας που σχετίζεται με την επίκτητη από την κοινότητα πνευμονία η οποία προκαλείται από τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *S. pneumoniae*.

Το λινεζολίδιο προσδένεται στην κοιλότητα της θέσης A στο κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς της μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος(50S) μέσα σε ένα θύλακα που αποτελείται από καθολικά συντηρημένα κατάλοιπα επικαλύπτοντας το αμινοάκυλο τμήμα ενός προσδεμένου στη θέση A tRNA, γεγονός που υποδηλώνει συναγωνισμό με τα νέο-εισερχόμενα υποστρώματα στη θέση A [6], καθώς και αρκετών κλινικά σημαντικών αντιβιοτικών [7]. Οι άλλες δύο δυνατές θέσεις πρόσδεσης των tRNAs με το ριβόσωμα, θέσεις P και E, μένουν ανεπηρέαστες από την παρουσία του λινεζολιδίου.

Συγκεκριμένα, το λινεζολίδιο τοποθετείται μέσα στον θύλακα με τέτοιο τρόπο, ώστε ο δακτύλιος-C να προσανατολίζεται προς τη διεπιφάνεια μεταξύ των

υπομονάδων, ενώ ο δακτύλιος-A καθώς και ο άνθρακας C5 στην κατεύθυνση της σήραγγας του ριβοσώματος. Μέσα στον θύλακα, ο δακτύλιος των οξαζολιδινών προσκολλάται(stacks) στο νουκλεοτίδιο U2504 και η C5-ουρά εκτείνεται προς το A2503, ενώ ο δακτύλιος-B βρίσκεται ανάμεσα στα νουκλεοτίδια A2451 και U2506 (εικόνα 13) [7].



Εικόνα 13: Α) Η λινεζολίδη (ροζ) υπερκαλύπτει τους προσδέτες της θέσης Α στο PTC του δεινόκοκκου. Β) Σύγκριση της θέσης πρόσδεσης της λινεζολίδης στην D50S με tRNA στη θέση Α (κίτρινο) και Ρ (πορτοκαλί) [7].

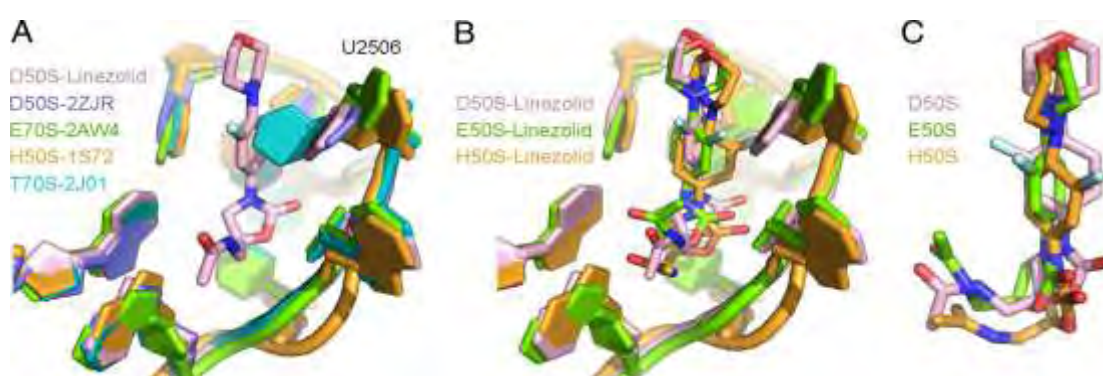
Το λινεζολίδιο σταθεροποιεί το νουκλεοτίδιο U2585 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει δεσμό υδρογόνου, αφού το N3 της U2585 βρίσκεται μέσα στην απόσταση που απαιτείται για να σχηματιστεί δεσμός υδρογόνου με το O4 του δακτυλίου-C του λινεζολιδίου (παράρτημα). Αυτό που είναι πραγματικά εντυπωσιακό είναι ότι αυτός ο σχετικά ασθενής δεσμός υδρογόνου φαίνεται να είναι ο μοναδικός δεσμός υδρογόνου που μπορεί να σχηματιστεί μεταξύ του φαρμάκου και του RNA υποβιβάζοντας έτσι την πλειοψηφία των επαφών μεταξύ του φαρμάκου και των νουκλεοτιδίων μέσα στο θύλακα του PTC σε λιγότερο πλούσιους σε ενέργεια δεσμούς van der Waals και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (εικόνα 14) [7].

Με εξαίρεση το νουκλεοτίδιο U2585 δεν παρατηρείται καμία σημαντική αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του RNA που σχηματίζει τον θύλακα πρόσδεσης όταν συνδέεται το λινεζολίδιο (εικόνα 15 A). Πράγματι, η στερεοδιαμόρφωση της πλειοψηφίας αυτών των νουκλεοτιδίων είναι σχεδόν πανομοιότυπη στο γεμάτο *E. coli* 70S, στην βελτιωμένη δομή του *Haloarcula marismortui* 50S, καθώς και στη δομή του *Thermus thermophilus* 70S-mRNA-tRNA. Μια ολοφάνερη εξαίρεση αποτελεί το ευέλικτο νουκλεοτίδιο U2506, το οποίο υφίσταται δομική αλλαγή κατά τη σωστή σύνδεση των tRNAs στη θέση A. Συνεπώς, ο περιορισμός της ευελιξίας αυτής της βάσης θα μπορούσε να είναι σημαντικός για τη σύνδεση και τον ανασταλτικό μηχανισμό των οξαζολιδινονών [7].



Εικόνα 14: Απεικονίζεται ο δεσμός υδρογόνου που μπορεί να δημιουργηθεί μεταξύ του N3 της U2585 και του O4 του δακτυλίου C.

Παρόλο που η γενική θέση του λινεζολιδίου στην υπομονάδα 50S του *D. radiodurans* είναι παρόμοια με αυτή στην *Haloarcula marismortui* 50S, καθώς και σε ένα θεωρητικό μοντέλο του φαρμάκου προσδεμένου σε ριβόσωμα *E. coli*, οι λεπτομέρειες όσον αφορά τους προσανατολισμούς των δακτυλίων και τις αλληλεπιδράσεις μέσα στο θύλακα φαίνεται να διαφέρουν (εικόνα 15 B και C). Παρόλα αυτά, η θέση πρόσδεσης για το λινεζολίδιο που προσδιορίστηκε στην 50S υπομονάδα του *D. radiodurans* συμφωνεί με τις ποικίλες συνδέσεις που παρατηρήθηκαν από τα φωτοδραστικά παράγωγα των οξαζολιδινονών σε ριβόσωμα *E. coli* [15].



Εικόνα 15: Σύγκριση του θύλακα πρόσδεσης της λινεζολίδης. A) Σύγκριση του θύλακα πρόσδεσης της native δομής της D50S (μπλε) με τη δομή της προσδεμένης στη D50S λινεζολίδης (ροζ), καθώς και της native δομής της 70S από *E. coli* (πράσινο), της πολύ καλά προσδιορισμένης δομής της 50S υπομονάδας από *H. marismortui* (πορτοκαλί) και *T. Thermophilus* (πράσινο). B) Σύγκριση του θύλακα πρόσδεσης της D50S (ροζ) με το μοντέλο

bound στην 70S από E. coli (πράσινο) και της δομής στην 50S από H. marismortui (πορτοκαλί). C). Σύγκριση της θέσης και προσανατολισμού της λινεζολίδης των δομών B.

4.1.5 Οξαζολιδινόνες και ανθεκτικότητα

Η αντοχή στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι συγγενής ή επίκτητη. Η συγγενής ανθεκτικότητα αναφέρεται σε κάποια ενδογενή αντοχή που βασίζεται στον μηχανισμό του φαρμάκου. Για παράδειγμα τα αναερόβια βακτήρια δεν έχουν τον οξυγόνο–εξαρτώμενο μηχανισμό μεταφοράς που απαιτείται ώστε οι αμινογλυκοσίδες να εισέλθουν στο βακτηριακό κύτταρο και έτσι είναι συγγενώς ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες.

Η επίκτητη αντοχή αναφέρεται στην απόκτηση ενός γονιδίου αντοχής από κάποιο βακτήριο που δεν είναι συγγενώς ανθεκτικό στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Δεν υπάρχει κανένα αντιβιοτικό για το οποίο να μην έχει αναπτυχθεί επίκτητη αντοχή, έστω και από λίγα είδη βακτηρίων.

Το κύριο ερέθισμα για την ανάπτυξη επίκτητης αντοχής στα αντιβιοτικά είναι η χρήση των ίδιων των αντιβιοτικών, καθώς η χρήση τους αναγκάζει τα βακτήρια να αναπτύξουν αντίσταση για να επιζήσουν. Όμως η πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής φαίνεται να εξαρτάται από το συγκεκριμένο φάρμακο και το συγκεκριμένο βακτήριο. Σε κάποιες περιπτώσεις μια απλή μετάλλαξη στο βακτηριακό γονιδίωμα είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή. Σε άλλες περιπτώσεις χρειάζονται πολλαπλές μεταλλάξεις για εμφάνιση φαινοτυπικής αντοχής. Οι τρεις κύριοι βιοχημικοί μηχανισμοί επίκτητης αντοχής είναι οι ακόλουθοι:

- ✓ Μειωμένη βακτηριακή διαπερατότητα που οφείλεται σε αλλαγές της κυτταρικής μεμβράνης των Gram –αρνητικών βακτηρίων.
- ✓ Παραγωγή βακτηριακών ενζύμων που μεταβάλλουν τη δομή του αντιβιοτικού. Τα ένζυμα μπορεί να είναι υδρολυτικά (πχ. β-λακταμάσες) ή μη υδρολυτική (πχ. ένζυμα που τροποποιούν τις αμινογλυκοσίδες).
- ✓ Μετατροπή του στόχου δράσης, όπου μια απλή μετάλλαξη στο σημείο που φυσιολογικά προσδένεται το αντιβιοτικό μπορεί να είναι ικανή να προκαλέσει κλινικά σημαντική αντοχή στο φάρμακο (πχ. ανθεκτικοί στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκοι) [17].

Όσον αφορά τις οξαζολιδινόνες, ανθεκτικότητα σε αυτές προκαλούν διάφορες μεταλλάξεις του 23S rRNA [8,9], ιδιαίτερα στην επικράτεια V [38,41,42], καθώς και μεταλλάξεις των πρωτεϊνών L3 και L4. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν στενά με την περιοχή πρόσδεσης των συγκεκριμένων αντιβιοτικών στο PTC [42].

Άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας περιλαμβάνουν μεθυλίωση από το γονίδιο *cfz* [8,9], ενός γονιδίου που κωδικεύει μια ριβοσωματική μεθυλομεταφοράση [41]. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει τροποποιημένη εκροή των αντιβιοτικών αυτών, μέσω ρύθμισης-επαγωγής (upregulation) μεταφορέων ABC [47]. Τέλος, αλλά όχι ήσσονος σημασίας, στην εμφάνιση ανθεκτικότητας συμβάλλει και η παρουσία τροποποιημένων νουκλεοτιδίων του ριβοσωμικού RNA [14]. Πιο συγκεκριμένα, ένας κοινός τρόπος με τον οποίο αποφεύγουν την αυτοκαταστροφή οι οργανισμοί που παράγουν αντιβιοτικά είναι η τροποποίηση καταλοίπων του RNA εκφράζοντας ειδικές μεθυλοτρανσφεράσες και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζουν την πρόσδεση του αντιβιοτικού στα ριβόσωμα [48,49]. Ως εκ τούτου, απενεργοποίηση αυτών των ενζύμων έχει παρατηρηθεί ότι είτε μειώνει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης είτε επηρεάζει αρνητικά τη συναρμολόγηση του ριβοσώματος [50,51,52,53,54].

5. Σταφυλόκοκκος

Το γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνει κοινά παθογόνα του ανθρώπου και των ζώων, που περιστασιακά προκαλούν νόσους δυνητικά επικίνδυνες για την ανθρώπινη ζωή. Οι σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις είναι συνήθεις λοιμώξεις του δέρματος και των πληγών, οι περισσότερες εκ των οποίων οφείλονται στη μεταφορά σταφυλόκοκκων στη φυσιολογική χλωρίδα, από ένα μολυσμένο αλλά ασυμπτωματικό άτομο σε ένα ευπαθές.

5.1 Βιολογία

Οι σταφυλόκοκκοι είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι, με διάμετρο 0.8-1.0 μm , οι οποίοι υποδιαιρούνται σε διάφορα επίπεδα σχηματίζοντας ακανόνιστες μάζες. Είναι μη σποριωτικοί οργανισμοί, αντέχουν στην ξηρασία και διασκορπίζονται εύκολα με τα σωματίδια της σκόνης μέσω του αέρα και πάνω σε επιφάνειες. Συγκεκριμένα, αν και ο αέρας δεν είναι κατάλληλο μέσο για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, τα συγκεκριμένα παθογόνα επιβιώνουν και παραμένουν ζωντανά μέσα στη σκόνη για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αυτό είναι αναμενόμενο, γιατί πρόκειται για θετικά κατά Gram βακτήρια τα οποία μπορούν να επιβιώσουν εκτός του ξενιστή για μεγάλα χρονικά διαστήματα χάρη στο παχύ κυτταρικό τους τοίχωμα.

Πρόκειται για προαιρετικά αερόβιους οργανισμούς που παράγουν οξύ από γλυκόζη τόσο υπό αερόβιες, όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες. Είναι θετικοί στην παραγωγή καταλάσης, δοκιμή που επιτρέπει το διαχωρισμό τους από το

Streptococcus και ορισμένα άλλα γένη θετικών κατά Gram κόκκων και αρνητικοί στην οξειδάση. Είναι το μόνο γένος αυτής της ομάδας που περιέχει τειχικό οξύ στο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ χαρακτηρίζονται από αρκετά χαμηλό περιεχόμενο G+C. Επιπλέον, τα μέλη του συγκεκριμένου γένους είναι μη κινητά, η διευθέτηση των κυττάρων τους θυμίζει σταφύλι, ενώ φημίζονται για την αλοανεκτικότητά τους (στην πραγματικότητα, σε μια συνήθη διαδικασία απομόνωσής τους, χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 7,5% σε NaCl) [55]. Σε διάφορα είδη παρατηρείται το φαινόμενο της μεταγωγής.

Ορισμένοι φαινότυποι που προσδίδονται από πλασμίδια στα μέλη του γένους *Staphylococcus* είναι η ικανότητα σύζευξης λόγω της παρουσίας συζευκτικών πλασμιδίων, η παραγωγή χρωστικών, η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, η ανθεκτικότητα σε κάδμιο, κοβάλτιο, υδράργυρο, νικέλιο και/ή ψευδάργυρο, καθώς και διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες όπως το ένζυμο πήξης αίματος, η αιμολυσίνη και η εντεροτοξίνη. Η σημασία της παραγωγής του ενζύμου πήξης του αίματος από ορισμένους σταφυλόκοκκους έγκειται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο ένζυμο με το να ευνοεί το σχηματισμό θρόμβων και ως εκ τούτου να εμποδίζει την εξάπλωση των σταφυλόκοκκων, διασφαλίζει όμως την προστασία τους από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Το πλέγμα ινώδους που παράγεται από τη δράση αυτού του ενζύμου είναι μάλλον η αιτία για την εξαιρετικά εντοπισμένη φύση πολλών σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων.

Οι σταφυλόκοκκοι αλληλεπιδρούν με το ανθρώπινο σώμα με πάρα πολλούς τρόπους, άλλοτε ευεργετικούς και άλλοτε επιβλαβείς. Αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος, της αναπνευστικής, γαστρεντερικής (του ειλεού και του παχέος εντέρου) και ουρογεννητικής οδού. Αν και είναι συνήθη παράσιτα των ανθρώπων, περιστασιακά προκαλούν σοβαρές μολύνσεις. Για τον άνθρωπο δύο είδη σταφυλόκοκκου έχουν ιδιαίτερη σημασία: ο *Staphylococcus epidermidis*, μια μη μελαχρωματική μορφή που συνήθως απαντά στο δέρμα ή στους βλεννώδεις υμένες, και ο *Staphylococcus aureus*, μια μελαχρωματική μορφή με κίτρινο χρώμα. Παρ' ότι και τα δύο είδη είναι δυνητικά παθογόνα, ο *S. aureus* συνδέεται συχνά με ανθρώπινες νόσους.

5.2 Επιδημιολογία και παθογένεση

Οι σταφυλόκοκκοι προκαλούν ποικίλες ασθένειες όπως ακμή, δοθιήνες, βλατίδες (φλύκταινες), μολυσματικά κηρία, πνευμονία, οστεομυελίτιδα, καρδίτιδα, μηνιγγίτιδα και αρθρίτιδα. Πολλά υγιή άτομα είναι φορείς του και στις περισσότερες περιπτώσεις αυτοί οι «ενδημικοί» σταφυλόκοκκοι δεν προκαλούν ασθένειες. Ωστόσο, τα βρέφη συχνά μολύνονται από τη μητέρα τους, ή μέσω της στενής επαφής με κάποιο άλλο

άτομο, την πρώτη εβδομάδα της ζωής τους. Σοβαρές σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις εμφανίζονται και όταν η αντίσταση του ξενιστή είναι χαμηλή λόγω ορμονικών αλλαγών, εξαντλητικών ασθενειών, τραυματισμών ή θεραπείας με στεροειδή ή άλλα φάρμακα που αποδυναμώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

Ο σταφυλόκοκκος αν και δεν διακρίνεται από αυτοκινησία, μπορεί να διαπεράσει τα λεμφικά αγγεία και να εναποτεθεί στους λεμφαδένες. Αν ο μικροοργανισμός φθάσει στο αίμα, τότε μεταφέρεται σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος, αν και συνήθως συγκεντρώνεται στο ήπαρ ή στον σπλήνα. Η διασπορά του παθογόνου μέσω του αίματος και του λεμφικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε γενικευμένη (διασυστηματική) λοίμωξη του σώματος και πολλαπλασιασμό του παθογόνου σε πολλούς ιστούς. Αν η ανάπτυξη του βακτηρίου στους ιστούς είναι πολύ εκτεταμένη, τότε διαχέεται στο αίμα σημαντικός αριθμός μικροοργανισμών με συνέπεια την εκδήλωση βακτηριαιμίας. Στις εκτεταμένες λοιμώξεις αυτού του τύπου, η αρχή γίνεται σχεδόν πάντοτε από κάποια τοπική λοίμωξη σε συγκεκριμένο όργανο.

Σημαντικές κλινικές διαγνωστικές δοκιμασίες για σταφυλόκοκκους είναι:

- ✓ **δοκιμασία οξειδωσης/ζύμωσης (O/F):** η αρχή στην οποία στηρίζεται η συγκεκριμένη δοκιμασία είναι στο γεγονός ότι ορισμένοι οργανισμοί παράγουν οξέα μόνο κατά την αναερόβια ανάπτυξή τους και χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση *Micrococcus* (μόνον αερόβια παραγωγή οξέος) από *Staphylococcus* (αναερόβια παραγωγή οξέος)
- ✓ **ένζυμο πήξης του αίματος:** περιλαμβάνει ανάμειξη πυκνού, υγρού βακτηριακού εναιωρήματος με πλάσμα, επώαση και ανίχνευση θρόμβου ινώδους και χρησιμοποιείται για τη διάκριση *S. aureus* (+) από *S. epidermidis* (-)
- ✓ **καταλάση:** πρόκειται για ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), η διαδικασία περιλαμβάνει προσθήκη σταγόνας H_2O_2 σε πυκνή καλλιέργεια και ανίχνευση φυσαλίδων O_2 , με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται διάκριση *Streptococcus* (-) από *Micrococcus*- *Staphylococcus* (+)

Κυτία ταχείας ταυτοποίησης που βασίζονται σε αναπτυξιακά χαρακτηριστικά υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο για αρκετές ομάδες ή και για είδη βακτηρίων, όπως για τα *Staphylococcus aureus*. Επιπλέον, στο εμπόριο διατίθενται ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων για την ταυτοποίηση αρκετών από τα κύρια μικροβιακά παθογόνα. Εκτός από τη χρησιμότητά τους στα κλινικά εργαστήρια, οι ανιχνευτές βρίσκουν επίσης εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και στους φορείς ελέγχου τροφίμων. Με τα παραπάνω συστήματα ανίχνευσης μπορεί να ελεγχθεί η παρουσία σημαντικών παθογόνων, όπως των *Salmonella* και *Staphylococcus*, στα τρόφιμα.

5.3 Θεραπεία και πρόληψη

Η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών είχε ως αποτέλεσμα την επιλογή των ανθεκτικών στελεχών του *Staphylococcus aureus* και του *Staphylococcus epidermidis*.

Νοσοκομειακές λοιμώξεις με σταφυλόκοκκους ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά εμφανίζονται συχνά σε ασθενείς με μειωμένη αντίσταση εξαιτίας άλλης ασθένειας, χειρουργικών επεμβάσεων ή ειδικής φαρμακευτικής θεραπείας. Οι ασθενείς συχνά αποκτούν σταφυλόκοκκους από μέλη του προσωπικού του νοσοκομείου που είναι ασυμπτωματικοί φορείς ανθεκτικών στελεχών. Αν και ορισμένες λοιμώξεις που πηγάζουν από τον κοινωνικό περίγυρο θεραπεύονται με πενικιλίνη, όσα παθογόνα στελέχη απομονώνονται πρέπει να ελέγχονται το καθένα χωριστά όσον αφορά την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά.

Είναι δύσκολο να γίνει πρόληψη των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων, διότι τα περισσότερα άτομα είναι ασυμπτωματικοί φορείς και ορισμένα νοσήματα, όπως η ακμή, μεταδίδονται μέσω απλής επαφής με μολυσμένα χέρια.

5.4 Staphylococcus epidermidis

Όσον αφορά τον *Staphylococcus epidermidis*, αν και μέχρι πρότινος θεωρούνταν ως ένα αβλαβές είδος το οποίο επιζούσε στο ανθρώπινο δέρμα χωρίς να βλάπτει αλλά ούτε και να ωφελεί τον ξενιστή του, τώρα πλέον θεωρείται ως ένα σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο. Μαζί με τον ακόμα πιο επικίνδυνο ξάδερφό του, τον *Staphylococcus aureus*, έρχεται πρώτος μεταξύ των αντιγόνων που προκαλούν νοσοκομειακές λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, αντιπροσωπεύει την πιο κοινή πηγή λοιμώξεων των indwelling medical devices και αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός είναι ένας μόνιμος και πανταχού παρών αποικιστής του ανθρώπινου δέρματος. Αν και σπάνια οι λοιμώξεις που προκαλεί είναι απειλητικές για τη ζωή του ασθενούς, η συχνότητά τους και το γεγονός ότι θεραπεύονται εξαιρετικά δύσκολα αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό φορτίο για το σύστημα της δημόσιας υγείας. Η θεραπεία περιπλέκεται λόγω της παρουσίας γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά και λόγω του σχηματισμού βιοφίλμ.

Η ανάλυση του γενώματός του έδειξε επίσης ότι είναι εξοπλισμένος με γονίδια που του προσδίδουν προστασία από τις σκληρές συνθήκες που συναντά στο ενδιαίτημά του. Για παράδειγμα, προκειμένου να ανταπεξέλθει στην υψηλή συγκέντρωση αλάτων και στην οσμωτική πίεση, διαθέτει οχτώ ανταλλάκτες ιόντων νατρίου/πρωτονίων και έξι συστήματα μεταφοράς οσμοπροστατευτικών ουσιών [56].

Αλληλουχίες τεσσάρων κλώνων *S. aureus* και δύο *S. epidermidis* συγκρίθηκαν, ώστε να περιγραφούν λεπτομερώς οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην αυξημένη μολυσματικότητα του *S. aureus*, την εξέλιξη του *S. epidermidis* από ένα αβλαβές σε ένα πιο επιθετικό παθογόνο και την εξέλιξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά αυτών των ειδών [5]. Η σύγκριση των αλληλουχιών τους αποκάλυψε 454 γονίδια που υπάρχουν μόνο στον *S. aureus* (strains COL, N315, Mu50 και MW2) και όχι στον *S. epidermidis* (RP62a ή ATCC 12228) και 286 γονίδια που υπάρχουν μόνο στον *S. epidermidis* και όχι στον *S. aureus*. Από τη σύγκριση βρέθηκε επίσης ότι 1681 γονίδια είναι συντηρημένα μεταξύ όλων των αποικιών των δύο ειδών [57].

Πρόσφατη μελέτη προσδιόρισε συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες που διευκολύνουν την προσβολή του ανοσοποιητικού και του δίνουν την ικανότητα πρόκλησης χρόνιων καταστάσεων.

6. Προσομοιώσεις

Το 1998 το βραβείο Νόμπελ στη Χημεία απονεμήθηκε στους John A. Pople και Walter Kohn για το έργο τους στην κβαντική χημεία, οι οποίοι δήλωσαν την ευρέως διαδεδομένη αποδοχή των υπολογιστών ως πολύτιμο εργαλείο στην έρευνα χημικών φαινομένων. Με την προέκταση αυτών στα βιολογικά συστήματα, το εύρος των πιθανών εφαρμογών της υπολογιστικής χημείας επεκτάθηκε αξιοσημείωτα.

Η πρώτη προσομοίωση μοριακής δυναμικής δημοσιεύτηκε το 1977 και αφορούσε την πρωτεΐνη BPTI. Μέχρι τότε οι πρωτεΐνες θεωρούνταν στατικές δομές. Στη διαμόρφωση αυτής της άποψης συνετέλεσαν οι κρυσταλλικές δομές που ήταν διαθέσιμες εκείνη την εποχή και έδιναν την εντύπωση άκαμπτων βιομορίων με το κάθε άτομο καλά στερεωμένο στη θέση του. Αυτή η στατική εικόνα άλλαξε και πλέον τα βιομόρια θεωρούνται δυναμικές δομές, τα άτομα των οποίων κινούνται συνεχώς σε συνηθισμένες θερμοκρασίες. Από τότε, η χρήση ποικίλων θεωρητικών και υπολογιστικών προσεγγίσεων έχει συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, όπως οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και οι μεμβρανικές διπλοστοιβάδες. Παρέχοντας λεπτομερέστατη πληροφορία που συχνά είναι μη προσβάσιμη πειραματικά, οι υπολογιστικές προσεγγίσεις που περιέχουν όλα τα άτομα ενός συστήματος μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας.

Στα χρόνια που μεσολάβησαν, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής αναπτύχθηκαν θεαματικά και βρίσκουν πλέον εφαρμογή σε διάφορους τομείς. Δύο

χαρακτηριστικά γνωρίσματα των προσομοιώσεων είχαν καθοριστικό ρόλο στη συνεχώς αυξανόμενη χρήση τους. Το πρώτο είναι το ό,τι παρέχουν τις κινήσεις μεμονωμένων ατόμων ως συνάρτηση του χρόνου και με αυτόν τον τρόπο μπορούν να απαντήσουν σε λεπτομερείς ερωτήσεις σχετικά με τις ιδιότητες ενός συστήματος, συχνά πιο εύκολα σε σύγκριση με τα πειράματα. Για πολλά θέματα αυτές οι λεπτομέρειες έχουν σημασία. Το δεύτερο είναι το ό,τι αν και η συνάρτηση δυναμικής ενέργειας που χρησιμοποιείται είναι προσεγγιστική, είναι τελείως στον έλεγχο του χρήστη, ο οποίος αφαιρώντας ή τροποποιώντας συγκεκριμένες συνεισφορές στη συνάρτηση μπορεί να αξιολογήσει τον ρόλο τους στον καθορισμό μιας συγκεκριμένης ιδιότητας.

Υπάρχουν τρεις τύποι εφαρμογών των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής στη μελέτη των μακρομορίων. Ο πρώτος τύπος χρησιμοποιεί την προσομοίωση απλά ως μέσο ελέγχου του εύρους των διαμορφώσεων. Ο δεύτερος τύπος χρησιμοποιεί τις προσομοιώσεις για να υπολογίσει τους μέσους ισορροπίας, συμπεριλαμβανομένου δομικών και κινητικών ιδιοτήτων. Ο τρίτος τύπος χρησιμοποιεί τις προσομοιώσεις για να μελετήσει την πραγματική δυναμική. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε προσομοιώσεις Monte Carlo είτε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Στην τρίτη περίπτωση, όμως, όπου οι κινήσεις και η εξέλιξή τους είναι που ενδιαφέρει μόνο προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής παρέχουν τη ζητούμενη πληροφορία.

Καίριας σημασίας για την επιτυχία κάθε υπολογιστικής προσέγγισης είναι η ποιότητα του μαθηματικού μοντέλου που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ενέργειας ενός συστήματος ως συνάρτηση της δομής του (force field, FF). Για μικρά συστήματα, μέχρι 100 άτομα, που μελετώνται στην αέρια φάση (gas phase), προσεγγίσεις κβαντικής μηχανικής είναι κατάλληλες. Τα βιοχημικά ή βιοφυσικά συστήματα τυπικά περιλαμβάνουν μακρομόρια που περιέχουν 1000-5000 ή και παραπάνω άτομα συν το περιβάλλον συμπυκνωμένης φάσης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε βιοχημικά συστήματα που περιέχουν 20000 άτομα ή και παραπάνω. Επιπλέον, λόγω της εγγενούς δυναμικής φύσης αυτών των συστημάτων και της κινητικότητας του περιβάλλοντός τους, απαιτείται μεγάλος αριθμός διαμορφώσεων που παράγονται με ποικίλες μεθόδους [58,59,60]. Συνεπώς, απαιτείται μια συνάρτηση ενέργειας που θα επιτρέψει 10^6 ή και παραπάνω ενεργειακού υπολογισμούς σε συστήματα των οποίων ο αριθμός των ατόμων τους είναι της τάξης των 10^5 ατόμων.

Οι εμπειρικές συναρτήσεις ενέργειας μπορούν να καλύψουν τις απαιτήσεις που ζητούνται στις υπολογιστικές μελέτες βιοχημικών και βιοφυσικών συστημάτων. Οι μαθηματικές εξισώσεις σε τέτοιου τύπου συναρτήσεις περιλαμβάνουν σχετικά

απλούς όρους για να περιγράψουν τις φυσικές αλληλεπιδράσεις που υπαγορεύουν η δομή και οι δυναμικές ιδιότητες των βιολογικών συστημάτων. Επιπλέον, τα εμπειρικά FF χρησιμοποιούν ατομιστικά μοντέλα, στα οποία τα άτομα είναι οι μικρότερες μονάδες του συστήματος και όχι τα ηλεκτρόνια και οι πυρήνες που χρησιμοποιούνται στην κβαντομηχανική. Αυτές οι δύο απλοποιήσεις επιτρέπουν υπολογιστική ταχύτητα, η οποία απαιτείται για να πραγματοποιηθεί ο απαιτούμενος αριθμός ενεργειακών υπολογισμών των βιομορίων στο περιβάλλον τους και, πιο σημαντικά, μέσω της χρήσης κατάλληλα βελτιστοποιημένων παραμέτρων στα μαθηματικά μοντέλα μπορεί να επιτευχθεί η ζητούμενη χημική ακρίβεια. Η χρήση εμπειρικών συναρτήσεων ενέργειας αρχικά εφαρμόστηκε σε μικρά οργανικά μόρια, όπου αναφερόταν ως μοριακή μηχανική [61], και πλέον εφαρμόζεται και σε βιολογικά συστήματα [59,60].

6.1 Συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας

Μια συνάρτηση δυναμικής ενέργειας είναι μια μαθηματική εξίσωση, που επιτρέπει τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας V ενός χημικού συστήματος ως συνάρτηση της τριδιάστατης δομής του (R). Η εξίσωση περιλαμβάνει όρους που περιγράφουν τις ποικίλες φυσικές αλληλεπιδράσεις που υπαγορεύουν η δομή και οι ιδιότητες του συστήματος. Η ολική δυναμική ενέργεια ενός συστήματος με καθορισμένη δομή ($V(R)_{total}$) μπορεί να χωριστεί στην εσωτερική ($V(R)_{internal}$) και την εξωτερική ($V(R)_{external}$) δυναμική ενέργεια.

$$\begin{aligned}
 V(R)_{total} &= V(R)_{internal} + V(R)_{external} \\
 V(R)_{internal} &= \sum_{bonds} K_b(b - b_0)^2 \\
 &\quad + \sum_{angles} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedrals} K_\chi[1 + \cos(n\chi - \sigma)] \\
 V(R)_{external} &= \sum_{nonbonded\ atom\ pairs} \left(\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{min,ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon_D r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$

Εικόνα 16: Οι τύποι της ολικής δυναμικής ενέργειας, καθώς και της εσωτερικής και εξωτερικής δυναμικής ενέργειας.

Οι εσωτερικοί όροι αναφέρονται σε άτομα που συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς, ενώ οι εξωτερικοί όροι αναπαριστούν τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων.

Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί η διαφορά μεταξύ των όρων που αφορούν την τριδιάστατη διαμόρφωση και οι οποίοι υπόκεινται στον υπολογισμό της ενέργειας και

των παραμέτρων των εξισώσεων. Οι όροι που αποκτώνται από την τριδιάστατη διαμόρφωση είναι τα μήκη των δεσμών, οι τιμές των γωνιών και οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων. Οι πειραματικές τιμές προκύπτουν από πειράματα κρυσταλλογραφίας ή NMR ή από δομές που έχουν προκύψει από συγκριτικό σχεδιασμό (homology modeling) ή από προσομοιώσεις. Οι υπόλοιποι όροι των παραπάνω εξισώσεων αναφέρονται ως παράμετροι. Οι συγκεκριμένοι όροι αφορούν τον τύπο κάθε ατόμου και τους τύπους των ατόμων με τα οποία είναι συνδεδεμένο κάθε άτομο. Για παράδειγμα, η παράμετρος q , το μερικό ατομικό φορτίο, ενός κατιόντος νατρίου είναι τυπικά ρυθμισμένο +1, ενώ ενός ανιόντος χλωρίου -1. Ένα άλλο παράδειγμα είναι ένας απλός δεσμός C-C σε σύγκριση με ένα διπλό δεσμό C=C, όπου οι παράμετροι του μεν πρώτου είναι $b_0 = 1.53 \text{ \AA}$ και $K_b = 225 \text{ kcal/ (mol} \cdot \text{\AA}^2)$ ενώ του δευτέρου $b_0 = 1.33 \text{ \AA}$ και $K_b = 500 \text{ kcal/ (mol} \cdot \text{\AA}^2)$. Με διαφορετικές παραμέτρους κάθε φορά οι ίδιες εξισώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για άτομα διαφορετικού τύπου και διαφορετικής συνδεσμολογίας. Συνεπώς, είναι η ποιότητα των παραμέτρων η οποία θα εγγυηθεί την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων. Η διαδικασία βελτιστοποίησης των παραμέτρων περιγράφεται εκτενέστερα σε επομένη παράγραφο.

6.2 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Η συμπεριφορά των βιομορίων, τα οποία είναι κβαντομηχανικές οντότητες, κάθε στιγμή περιγράφεται καλύτερα από κβαντομηχανικές εξισώσεις κίνησης, όπως είναι λόγου χάρη η χρονικά εξαρτώμενη εξίσωση του Schrodinger. Όμως, επειδή η συγκεκριμένη εξίσωση είναι πολύ δύσκολο να επιλυθεί για μεγάλα συστήματα, χρησιμοποιείται μια απλούστερη κλασική μηχανική περιγραφή για να περιγράψει την κίνηση που εκτελείται από τα βαριά άτομα του συστήματος. Ως εκ τούτου, στις περισσότερες υπολογιστικές μελέτες βιομορίων επιλύεται η κλασική μηχανική εξίσωση κίνησης του Νεύτωνα, η οποία στην πιο απλή της μορφή γράφεται ως

$$F_i = m_i a_i = m_i d^2 r / dt^2,$$

όπου F_i είναι η δύναμη που ασκείται σε i μόρια μάζας m , a είναι η επιτάχυνση και $d^2 r / dt^2$ η δεύτερη παράγωγος της θέσης του κάθε σωματιδίου ως προς τον χρόνο. Η δύναμη F_i καθορίζεται από την κλίση της δυναμικής ενέργειας, $U(r)$, η οποία είναι συνάρτηση όλων των ατομικών συντεταγμένων r .

6.3 Εκτέλεση μιας προσομοίωσης

6.3.1 Προσδιορισμός αρχικών τιμών

A. Αρχικές συντεταγμένες

Αποκτώνται από δομές πειραματικά ή υπολογιστικά προσδιορισμένες, παρόλα αυτά πολύ πιθανόν να χρειάζονται κάποια επεξεργασία πριν χρησιμοποιηθούν ως αρχικές τιμές της προσομοίωσης. Για παράδειγμα, σε μια δομή που έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά λείπουν οι συντεταγμένες πολλών υδρογόνων, οι οποίες πρέπει να προστεθούν πριν ξεκινήσει η προσομοίωση και υπάρχουν αρκετοί αλγόριθμοι για το συγκεκριμένο σκοπό. Ένα άλλο παράδειγμα αφορά πειραματικά προσδιορισμένες δομές πρωτεϊνών από τις οποίες λείπουν ολόκληρα τμήματα, που συνήθως αποτελούν ευέλικτα τμήματα της πρωτεΐνης ή τμήματα που σκόπιμα έχουν απομακρυνθεί, ώστε να απλουστευτεί η διαδικασία κρυστάλλωσης. Τα συγκεκριμένα τμήματα πρέπει επίσης με κάποιο τρόπο να μοντελοποιηθούν.

Αφού πλέον δε λείπει κανένα άτομο από τη δομή, είναι καλό να προηγηθεί μια ελαχιστοποίηση ενέργειας της δομής πριν την εξισορρόπηση, ώστε να βελτιωθεί η αρχική δομή. Ο ρόλος αυτής της ελαχιστοποίησης είναι να απαλλάξει από μη δεσμικές επικαλύψεις και να χαλαρώσει τα μήκη των δεσμών, καθώς και τις παραμορφώσεις των γωνιών στην πειραματικά προσδιορισμένη δομή.

B. Αρχικές ταχύτητες

Αντίθετα με τις αρχικές συντεταγμένες, οι οποίες μπορούν να αποκτηθούν από τις πειραματικά προσδιορισμένες δομές, η μόνη σχετική με τις ταχύτητες πληροφορία είναι η θερμοκρασία του συστήματος T , η οποία καθορίζει την κατανομή των ταχυτήτων. Απουσία καλύτερης πληροφορίας, οι αρχικές ταχύτητες προσδιορίζονται συνήθως από την κατανομή ταχυτήτων Maxwell σε θερμοκρασία T ,

$$P(v)dv = \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \exp \left[\frac{-mv^2}{2k_B T} \right] dv$$

Η αρχική απόδοση των ταχυτήτων φυσικά δεν είναι σε ισορροπία. Πιο συγκεκριμένα, η αναμενόμενη συσχέτιση ταχυτήτων μεταξύ γειτονικών ατόμων δε διασφαλίζεται και το πιο πιθανό είναι να μην υπάρχει. Επιπλέον, λόγω της τυχαίας απόδοσης μπορεί να αποδοθούν τυχαία υψηλές ταχύτητες σε μια περιορισμένη ομάδα ατόμων καθιστώντας τα "hot spot" και αυτό κάνει την

προσομοίωση ασταθή και μπορεί να σταματήσει. Προκειμένου να εμποδίσουμε αυτό να συμβεί, μπορούμε να ξεκινήσουμε την προσομοίωση με ένα στάδιο κατά τη διάρκεια του οποίου αυξάνουμε σταδιακά τη θερμοκρασία μέχρι να φτάσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία.

6.3.2 Επιλογή του κατάλληλου βήματος ολοκλήρωσης

Η επιλογή του βήματος που θα χρησιμοποιηθεί στην προσομοίωση είναι πολύ σημαντική παράμετρος, η οποία καθορίζει το μέγεθος του σφάλματος που σχετίζεται με τον εκάστοτε αλγόριθμο ολοκλήρωσης. Ένα μικρό βήμα μπορεί να διασφαλίζει καλύτερη ποιότητα αποτελεσμάτων, χρειάζονται όμως περισσότεροι κύκλοι για το ίδιο μήκος προσομοίωσης. Ως εκ τούτου, σε κάθε προσομοίωση γίνεται προσπάθεια εξισορρόπησης οικονομίας και ακρίβειας και ο σημαντικότερος παράγοντας είναι το βήμα που θα χρησιμοποιηθεί στην προσομοίωση. Το βέλτιστο θα ήταν να επιλεγεί το μεγαλύτερο βήμα που εγγυάται έγκυρα και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Το καταλληλότερο βήμα θα πρέπει να είναι μικρό σε σύγκριση με την περίοδο της γρηγορότερης κίνησης (μέγιστη συχνότητα κίνησης) που λαμβάνει χώρα. Αν τ είναι η περίοδος της γρηγορότερης κίνησης τότε ένας καλός κανόνας για την επιλογή Δt είναι: $\tau / \Delta t \approx 20$.

Για τα βιομόρια, όπως λόγω χάρη οι πρωτεΐνες, οι πιο γρήγορες κινήσεις είναι δονήσεις των δεσμών που ενώνουν άτομα υδρογόνου με βαριά άτομα (έκταση X-H). Η συχνότητα αυτών των κινήσεων είναι στην περιοχή των 3000 cm^{-1} , που σημαίνει περίοδοι της τάξεως των 10 fs ($1 \times 10^{-14} \text{ s}$). Συνεπώς, το κατάλληλο $\Delta t \approx 0.5 \text{ fs}$. Αυτό το εξαιρετικά μικρό βήμα είναι ο κύριος ρόλος που, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής περιορίζονται στην κλίμακα των nanosecond (10^{-9} s).

Όπως είναι αναμενόμενο, πολλή προσπάθεια γίνεται για να αναπτυχθούν αλγόριθμοι οι οποίοι θα επιτρέπουν μεγαλύτερα βήματα, άρα και μεγαλύτερης διάρκειας προσομοιώσεις. Η λογική αρκετών προσπαθειών είναι να αφαιρεθούν οι γρήγορες (υψηλής συχνότητας) κινήσεις οι οποίες θα ληφθούν υπόψη με κάποιον άλλο τρόπο. Επειδή όμως υπάρχει σύζευξη μεταξύ των διαφορών τύπων κινήσεων, δεν είναι απλό. Το πρώτο βήμα προς αυτήν τη κατεύθυνση είναι να αφαιρεθούν οι κινήσεις έκτασης των ατόμων X-H. αν αφαιρεθούν αυτές οι κινήσεις οι επόμενες πιο γρήγορες κινήσεις είναι αυτές μεταξύ X-X με συχνότητες της τάξεως των 1500 cm^{-1} . Το βήμα σε αυτήν την περίπτωση διπλασιάζεται $\Delta t \approx 1.0 \text{ fs}$ επιμηκύνοντας ελαφρώς το μήκος της προσομοίωσης.

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται συχνά για τον υπολογισμό των θέσεων των υδρογόνων είναι ο SHAKE [33,34] και η παραλλαγή του ο RATTLE [35]. Με απλά λόγια, ο αλγόριθμος υποθέτει ότι τα μήκη των δεσμών X-H μπορούν να θεωρηθούν σταθερά. Ο αλγόριθμος SHAKE μπορεί βέβαια να εφαρμοστεί όχι μόνο στους δεσμούς X-H, αλλά και στις stretching κινήσεις όλων των δεσμών, επιτρέποντας προσομοιώσεις με βήματα 2 ή 3 fs, ανάλογα με τις λεπτομέρειες του συστήματος.

6.3.3 Σταθερότητα ολοκλήρωσης

Ένα σημαντικό θέμα σε κάθε αριθμητική μελέτη είναι αυτό της ακρίβειας και της σταθερότητας της προσομοίωσης. Σε γενικές γραμμές, μια προσομοίωση γίνεται ασταθής όταν έχει συσσωρεύσει λάθη ενώ είναι σε εξέλιξη και έχει γίνει πλέον ασήμαντη. Στόχος του ερευνητή είναι να διατηρήσει μια προσομοίωση σταθερή τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα της μελέτης. Συνεπώς, η σταθερότητα της προσομοίωσης θα πρέπει να εκτιμάται κάθε στιγμή. Αν είναι τυχερός κανείς, μια ασταθής προσομοίωση θα σταματήσει πριν φτάσει στο τέλος. Μπορεί, όμως, αν και ασταθής να φτάσει στο επιθυμητό τέρμα, αλλά το περιεχόμενο θα είναι πενιχρής σημασίας. Οι καλύτεροι εκτιμητές της σταθερότητας μιας προσομοίωσης είναι οι σταθερές της κίνησης, ποσότητες που αναμένεται να διατηρούνται σταθερές.

6.3.4 Έξυπνα τεχνάσματα για να βελτιωθούν η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής

Ένα ευρέως διαδεδομένο τεχνάσμα είναι η εφαρμογή neighbor list. Συγκεκριμένα, αν προσομοιώσουμε μεγάλο σύστημα N ατόμων και χρησιμοποιήσουμε ένα cutoff μικρότερο από το simulation box, τότε πολλά άτομα δεν συνεισφέρουν σημαντικά στην ενέργεια ενός ατόμου i . Είναι επωφελές λοιπόν να εξαιρέσουμε από τη δαπανηρή διαδικασία υπολογισμού της ενέργειας ζεύγη ατόμων τα οποία δεν αλληλεπιδρούν. Αυτή η τεχνική αυξάνει την αποτελεσματικότητα των προσομοιώσεων.

Άλλες τεχνικές είναι οι εξής:

- ✓ Προσομοιώσεις σταθερής θερμοκρασίας και σταθερής πίεσης
- ✓ Μέθοδοι περιορισμένων και πολλαπλών βημάτων
- ✓ Συνθήκες περιοδικής οριοθέτησης (periodic boundary conditions)
- ✓ Αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας και εκτεταμένη ηλεκτροστατική
- ✓ Solvation models

6.4 Προηγμένες τεχνικές και μελλοντική κατεύθυνση

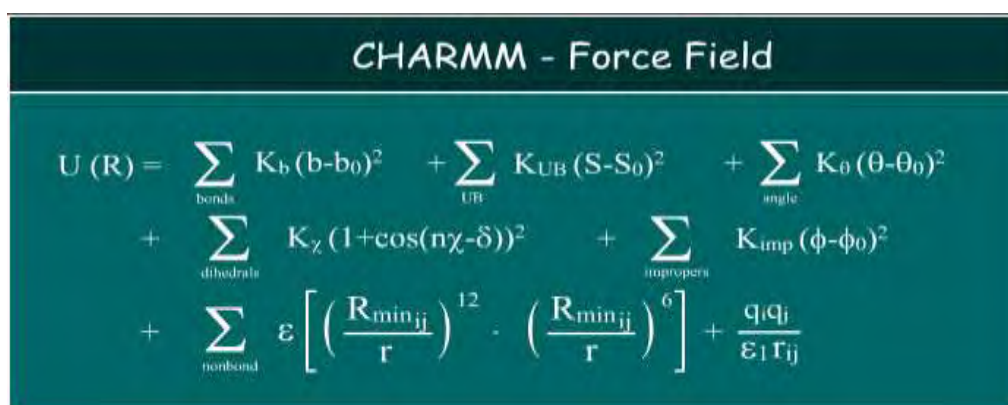
Μέθοδοι με πολλαπλά βήματα ολοκλήρωσης

Οι συγκεκριμένες μέθοδοι επιτρέπουν τη χρήση πολλών διαφορετικών βημάτων ολοκλήρωσης στην ίδια προσομοίωση, έτσι ώστε να περιγράφουν καλύτερα τη χρονική εξέλιξη των αργών, αλλά και των γρήγορων κινήσεων αποτελεσματικότερα [36,37,38,39].

Multibody order (N) dynamics

Η μέθοδος αυτή συναθροίζει τα άτομα ενός μακρομορίου σε ομάδες ευέλικτων και άκαμπτων σωμάτων [40].

Στην παρούσα πτυχιακή χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics).


$$\begin{aligned} U(\mathbf{R}) = & \sum_{\text{bonds}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{UB}} K_{\text{UB}} (S - S_0)^2 + \sum_{\text{angle}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \\ & + \sum_{\text{dihedrals}} K_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta))^2 + \sum_{\text{ισοτοπία}} K_{\text{imp}} (\phi - \phi_0)^2 \\ & + \sum_{\text{nonbond}} \epsilon \left[\left(\frac{R_{\text{min}ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\text{min}ij}}{r} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \end{aligned}$$

Εικόνα 17: Η συνάρτηση που χρησιμοποιεί το πεδίο δυνάμεων CHARMM για τον υπολογισμό της δυναμικής ενέργειας [65].

7. Μη αυτόματη παραμετροποίηση

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής συχνά χρειάζεται να μελετηθούν μόρια για τα οποία η τοπολογία και οι παράμετροι δεν υπάρχουν. Το συγκεκριμένο βοήθημα παραθέτει τις βασικές γνώσεις για τη δημιουργία της τοπολογίας μιας ένωσης χρησιμοποιώντας ως βάση ήδη υπάρχουσες τοπολογίες για άλλες ενώσεις, χωρίς να απαιτείται η ανάπτυξη νέων παραμέτρων για όλα τα άτομα.

Απαιτούμενα προγράμματα:

1. **VMD**: το συγκεκριμένο πρόγραμμα είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

2. **NAMD**: προϋποτίθεται ότι το NAMD είναι σωστά εγκατεστημένο στον υπολογιστή. Το βοήθημα του NAMD είναι διαθέσιμο και για συστήματα Unix/MacOSX και Windows στις παρακάτω διευθύνσεις [71]:
<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-unixhtml/>
<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/namd/namd-tutorial-winhtml/>
3. ένας **επεξεργαστής κειμένου** της επιλογής μας όπως:
 - ✓ UNIX: nedit (www.nedit.org)
 - ✓ Windows XP: WordPad. Συνίσταται η χρήση του WordPad και όχι του NotePad για αυτό το tutorial. Σιγουρευτείτε ότι έχετε σώσει τα αρχεία με την κατάληξη .txt και όχι με κατάληξη .rtf ή .doc
 - ✓ Mac OS X: Smultron (smultron.sourceforge.net), TextEdit
4. μια **γραμμή εντολών**, όπως είναι ένα τερματικό στα συστήματα UNIX ή μια γραμμή εντολών DOS στα Windows.

Έχοντας υπόψη για παράδειγμα το διατομικό μόριο του H_2 το οποίο στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σχεδιάζεται ως δύο μάζες ατόμων ενωμένες με έναν απλό δεσμό, δύο είδη πληροφοριών απαιτούνται για να προσομοιωθεί αυτό το μόριο:

- ✓ πληροφορίες που να αναφέρουν με ποια άτομα είναι συνδεδεμένο κάθε άτομο
- ✓ πληροφορίες που να αναφέρουν την ακαμψία του κάθε δεσμού καθώς και το μήκος δεσμού

Το παραπάνω απλό παράδειγμα δηλώνει ότι αν θέλει κανείς να προσομοιώσει ένα πιο πολύπλοκο μόριο τότε το FF θα περιέχει για τη συγκεκριμένη ένωση:

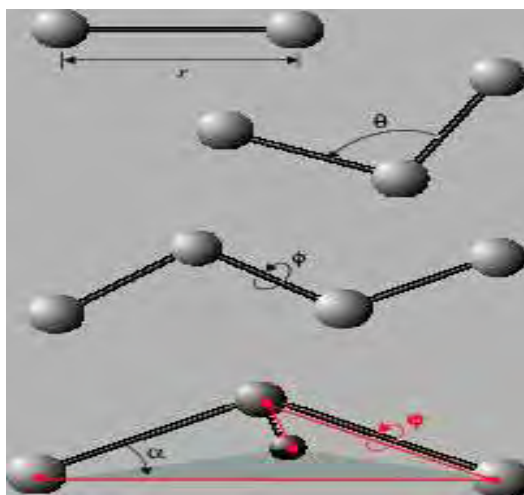
- ✓ ένα αρχείο τοπολογίας (topology file),
- ✓ ένα αρχείο παραμέτρων (parameter file).

7.1 Αρχείο τοπολογίας

Στο αρχείο τοπολογίας προσδιορίζεται ο τύπος κάθε ατόμου (sp^2 άνθρακας, sp^3 άνθρακας κλπ.), η μάζα, καθώς και το μερικό φορτίο του κάθε ατόμου. Ενώ τα μερικά φορτία που αποδίδονται στα άτομα του ίδιου τύπου διαφέρουν μεταξύ καταλοίπων, οι μάζες τους παραμένουν ίδιες. Συνεπώς, η μάζα κάθε τύπου ατόμου ορίζεται μια φορά στην αρχή του αρχείου (MASS statement). Αυτή η καταχώρηση αντιστοιχεί έναν ακέραιο αριθμό σε κάθε τύπο ατόμου ο οποίος χρησιμοποιείται στη δημιουργία αρχείων psf τύπου CHARMM [65]. Επιπλέον, το συγκεκριμένο αρχείο μας πληροφορεί για τη συνδεσιμότητα των ατόμων δηλαδή με ποια άτομα είναι ενωμένο κάθε άτομο με τον προσδιορισμό όλων των δεσμών, γωνιών (προαιρετικά) και

διδρων γωνιών (προαιρετικά). Η συνδεσιμότητα των ατόμων απεικονίζεται στην εικόνα που ακολουθεί και χρησιμοποιεί τα ονόματα των ατόμων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα ονόματα των ατόμων στο αρχείο τοπολογίας να αντιστοιχούν στα ονόματα των ατόμων στο αρχείο pdb. Δίνοντας μια πλήρη λίστα των ατόμων και το σύνολο των δεσμών, το πρόγραμμα rsfgen μπορεί να δημιουργήσει τη σωστή τοπολογία για το μόριο. Επιπλέον, παρατίθενται και συγκεκριμένες δομικές πληροφορίες, όπως οι διπλοί δεσμοί μεταξύ συγκεκριμένων ατόμων, οι καταχρηστικές γωνίες και οι δότες-αποδέκτες ατόμων υδρογόνων. Στο τέλος παρατίθενται και οι εσωτερικές συντεταγμένες η σύνταξη των οποίων θα αναλυθεί παρακάτω. Διαφορετικές τοπολογίες ατόμων παρατίθενται στην εικόνα 18.

Προσδιορίζονται, λοιπόν, οι δεσμοί (μεταξύ 2 ατόμων), οι γωνίες (μεταξύ 3 ατόμων) και οι διέδρες γωνίες (μεταξύ 4 ατόμων ενωμένων γραμμικά). Αν υπάρχει πλήρης λίστα των δεσμών, οι γωνίες μεταξύ τριών ατόμων καθώς και οι διέδρες γωνίες συνεπάγονται και συνεπώς μπορούν να παραλειφθούν. Να σημειωθεί ότι οι καταχρηστικές γωνίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να περιορίσουν τα χειρόμορφα και επίπεδα κέντρα, πρέπει να οριστούν με σαφήνεια. Οι καταχρηστικές γωνίες χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν τον πεπτιδικό δεσμό των αμινοξέων επίπεδο.



Εικόνα 18: Τοπολογίες ατόμων. Από την αρχή ως το τέλος παρατίθενται οι τοπολογίες των δεσμών, των γωνιών, των διέδρων και των καταχρηστικών γωνιών. Οι δυναμικές ενέργειες υπολογίζονται μετρώντας το μήκος δεσμού (r), τη γωνία (θ), τη διέδρη (φ) και την καταχρηστική γωνία (α). Να σημειωθεί ότι η απόκλιση (α) δεν χρησιμοποιείται στο μοντέλο δυναμικής ενέργειας, αλλά παρατίθεται για να προσδιορίσει τις καταχρηστικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί η επίπεδη δομή του μορίου.

Το CHARMM FF περιέχει την τοπολογία και τις παραμέτρους για τα 20 βασικά αμινοξέα, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και μερικές άλλες οργανικές ενώσεις. Συνεπώς, μπορεί κανείς να προσομοιώσει κάθε πρωτεΐνη, DNA ή μοριακό σύστημα που αποτελείται από αυτούς τους βασικούς δομικούς λίθους.

Σε περίπτωση, όμως, που θέλουμε να προσομοιώσουμε ένα σύστημα που εμπεριέχει ένα μόριο που δεν περιγράφεται στα αρχεία τοπολογίας και παραμέτρων του CHARMM, δεν χρειάζεται απαραίτητα να δημιουργήσουμε εκ νέου όλες τις παραμέτρους για το μόριο, παρά μόνο αυτές που λείπουν.

Υπάρχει μια ευρεία ποικιλία αμινοξέων, φυσικών και μη, και άλλων μορίων που θα μπορούσαν να προσομοιωθούν συνδυάζοντας παραμέτρους που ήδη υπάρχουν στο πεδίο δυνάμεων CHARMM. Ο μόνος περιορισμός προέρχεται από τους δεσμούς, τις γωνίες, καθώς και τις καταχρηστικές και δίεδρες γωνίες που ήδη υπάρχουν και αφορούν τους τύπους ατόμων που υπάρχουν στο μόριο του οποίου την τοπολογία θέλουμε να προσδιορίσουμε.

Παρακάτω παρατίθεται, ως παράδειγμα, η τοπολογία της αλανίνης.

Οι παραπάνω καταχωρήσεις παρέχουν τις εξής πληροφορίες:

✓ **RESI ALA 0.00**

υποδεικνύει ένα καινούριο κατάλοιπο με την ονομασία ALA (αλανίνη) και με ολικό ηλεκτρικό φορτίο 0.00

✓ **GROUP**

υποδεικνύει ότι τα ακόλουθα άτομα (μέχρι την επόμενη καταχώρηση GROUP) είναι μέρος ενός συνόλου ατόμων τα οποία φέρουν ολικό φορτίο ακέραιο αριθμό. Τα groups αποτελούνται συχνά από άτομα τα οποία αλληλεπιδρούν ηλεκτρονιακά. Τα άτομα, λοιπόν, N, HN, CA, και HA σχηματίζουν ένα group ατόμων με καθαρό φορτίο 0.00.

✓ **ATOM N NH1 -0.47 !**

υποδεικνύει ότι ένα νέο άτομο με το όνομα N, είναι τύπου NH1 και φέρει φορτίο - 0.47. Το θαυμαστικό ! δηλώνει την ύπαρξη σχολίου δηλαδή ό,τι ακολουθεί μετά από αυτό στη γραμμή δε λαμβάνεται υπόψη.

✓ **BOND CB CA N HN N CA**

υποδεικνύει ομάδες ζευγών ατόμων που συνδέονται με απλό δεσμό. Οι δεσμοί δημιουργούνται μεταξύ διαδοχικών ατόμων. Συνεπώς, δημιουργείται ένας δεσμός μεταξύ των ατόμων CB και CA, ένας μεταξύ N και HN και ένας μεταξύ N και CA. Η

καταχώρηση BOND στην επόμενη σειρά διαβάζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και τοποθετείται στην επόμενη σειρά ώστε να είναι ευανάγνωστη.

✓ **DOUBLE O C**

υποδηλώνει απλώς ότι τα άτομα με ονόματα O και C είναι συνδεδεμένα. Ο όρος DOUBLE είναι συνώνυμος με τον όρο BOND και δεν επηρεάζει το εξαγόμενο αρχείο psf. Το γεγονός ότι υπάρχει ένας διπλός δεσμός μεταξύ αυτών των ατόμων λαμβάνεται υπόψη στις παραμέτρους και όχι στην τοπολογία.

✓ **IMPR N -C CA HN C CA +N O**

υποδηλώνει ομάδες 4 ατόμων για τα οποία η καταχρηστική δεσμική αλληλεπίδραση λαμβάνεται υπόψη. Το κέντρο χειρομορφίας γράφεται πρώτο. Συγκεκριμένα, ένας καταχρηστικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ των ατόμων N, C, CA, και HN, με το N να είναι στο κέντρο και ένας δημιουργείται μεταξύ των ατόμων C, CA, N, και O, με το C στο κέντρο. Όπως προαναφέρθηκε, οι καταχρηστικοί δεσμοί δημιουργούνται για να διατηρήσουν τη δομή επίπεδη και αυτοί οι δυο δεσμοί διατηρούν τον πρωτεϊνικό σκελετό επίπεδο.

✓ **DONOR and ACCEPTOR καταχωρήσεις**

δεν χρησιμοποιούνται από το πεδίο δυνάμεων CHARMM ή το NAMD. Απλώς, υποδηλώνουν ότι τα άτομα μπορούν να δρουν ως δότες και δέκτες υδρογόνων, αλλά εφόσον το πεδίο δυνάμεων CHARMM δεν περιλαμβάνει πλέον ειδικό ενεργειακό όρο για τους δεσμούς υδρογόνου, αυτές οι καταχωρήσεις δε λαμβάνονται υπόψη.

✓ **IC -C CA *N HN 1.3551 126.4900 180.0000 115.4200 0.9996**

Η σύντηξη IC σημαίνει εσωτερικές συντεταγμένες (internal coordinates). Οι συγκεκριμένες καταχωρήσεις παρέχουν ένα πλήρες σύνολο συντεταγμένων για άτομα σχετικά με άλλα άτομα στο κατάλοιπο. Συνεπώς, αν λείπουν άτομα από μια δομή (όπως για παράδειγμα άτομα H από μια κρυσταλλογραφική δομή ενός αρχείου PDB), το συνολικό μόριο μπορεί παρόλα αυτά να δημιουργηθεί με βάση τις θέσεις των ήδη υπάρχοντων ατόμων. Η καταχώρηση IC προσδιορίζει τα μήκη δεσμών, γωνία και δίδερα (ή καταχρηστική) γωνία για ομάδες 4 ατόμων. Συγκεκριμένα, η σύνταξη μπορεί να είναι είτε:

IC A B C D [bond(AB)] [angle(ABC)] [dihedral(ABCD)] [angle(BCD)] [bond(CD)] είτε
IC A B *C D [bond(AC)] [angle(BCA)] [improper(ABCD)] [angle(BCD)] [bond(CD)] .

Το σύμβολο * δίπλα στο άτομο C υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο άτομο είναι στο κέντρο μιας καταχρηστικής γωνίας. Όταν δεν υπάρχει αυτό το σύμβολο σημαίνει ότι τα άτομα δεν έχουν καταχρηστική τοπολογία.

Στο παραπάνω παράδειγμα, τα άτομα C και N έχουν μήκος δεσμού 1.3551 Å, τα άτομα CA, N και C σχηματίζουν γωνία 126.4900°, τα άτομα C, CA, N και HN σχηματίζουν καταχρηστική γωνία 180.0000°, τα άτομα CA, N και HN σχηματίζουν

γωνία 115.4200° και τα άτομα N και HN έχουν μήκος δεσμού 0.9996 Å. Το άτομο N είναι το κεντρικό άτομο μιας καταχρηστικής τοπολογίας [62].

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο υπολογισμός των IC's δεν είναι απαραίτητος αν το αρχείο PDB περιέχει όλα τα άτομα. Οι καταχωρήσεις αυτές απλά παραθέτονται ώστε να επιτρέπεται η αυτόματη εκχώρηση των συντεταγμένων των υδρογόνων και άλλων ατόμων που λείπουν από την κρυσταλλική δομή.

```
[frame=single, framerule=1.2mm, framesep=3mm, label=Alanine
Topology Entry,
fontsize=\scriptsize]
RESI ALA 0.00
GROUP
ATOM N NH1 -0.47
ATOM HN H 0.31
ATOM CA CT1 0.07
ATOM HA HB 0.09
GROUP
ATOM CB CT3 -0.27
ATOM HB1 HA 0.09
ATOM HB2 HA 0.09
ATOM HB3 HA 0.09
GROUP
ATOM C C 0.51
ATOM O O -0.51
BOND CB CA N HN N CA
BOND C CA C +N CA HA CB HB1 CB HB2 CB HB3
DOUBLE O C
IMPR N -C CA HN C CA +N O
DONOR HN N
ACCEPTOR O C
IC -C CA *N HN 1.3551 126.4900 180.0000 115.4200 0.9996
IC -C N CA C 1.3551 126.4900 180.0000 114.4400 1.5390
IC N CA C +N 1.4592 114.4400 180.0000 116.8400 1.3558
IC +N CA *C O 1.3558 116.8400 180.0000 122.5200 1.2297
IC CA C +N +CA 1.5390 116.8400 180.0000 126.7700 1.4613
IC N C *CA CB 1.4592 114.4400 123.2300 111.0900 1.5461
IC N C *CA HA 1.4592 114.4400 -120.4500 106.3900 1.0840
IC C CA CB HB1 1.5390 111.0900 177.2500 109.6000 1.1109
IC HB1 CA *CB HB2 1.1109 109.6000 119.1300 111.0500 1.1119
IC HB1 CA *CB HB3 1.1109 109.6000 -119.5800 111.6100 1.1114
```

Εικόνα 19: Ένα ενδεικτικό τμήμα της τοπολογίας της αλανίνης.

Κατά τη δημιουργία της τοπολογίας αν κάποιες πληροφορίες λείπουν ή υπάρχει κάποιο λάθος, λόγου χάρη παρατίθεται η ίδια πληροφορία δύο φορές, το psfgen παράγει προειδοποιητικά μηνύματα στην κονσόλα που καθοδηγούν τον χρήστη και δεν τον αφήνει να κάνει λάθη.

Όταν θέλουμε να δημιουργήσουμε καινούρια τοπολογία για ένα συγκεκριμένο άτομο, μπορούμε είτε να του δώσουμε ένα καινούριο όνομα είτε ένα όνομα που ήδη υπάρχει. Υπάρχει μια ποικιλία φυσικών και μη αμινοξέων και άλλα μόρια που

μπορούν να προσομοιωθούν συμπληρώνοντας τις παραμέτρους που ήδη υπάρχουν. Αν επιλέξουμε να του δώσουμε ένα ήδη υπάρχον όνομα τα πράγματα είναι απλά σε σύγκριση με το αν επιλεγεί η άλλη περίπτωση.

Όταν δημιουργούμε έναν νέο τύπο ατόμου, το πρώτο πράγμα που πρέπει να σκεφθούμε είναι να ορίσουμε τις παραμέτρους που αφορούν δυνάμεις van der Waals αυτού του συγκεκριμένου ατόμου αλλά και των γειτονικών του, καθώς επίσης να δημιουργήσουμε και τις παραμέτρους για τους δεσμούς, τις γωνίες και τα δίεδρα που σχηματίζονται και να προστεθούν στο εκάστοτε FF.

Αν επιλέξουμε να δώσουμε δικό μας όνομα στο νέο τύπο ατόμου, θα πρέπει να είναι μοναδικό. Θα του αποδώσουμε το φορτίο εκείνου του τύπου του ατόμου που μοιάζει περισσότερο με αυτό που συγκρίνουμε. Στη συνέχεια, προκειμένου να ορίσουμε τους δεσμούς αυτού του ατόμου, θα δανειστούμε τη σταθερά εκείνου του δεσμού που μοιάζει περισσότερο με τον δεσμό της ένωσης που παραμετροποιείται, ενώ το μήκος του δεσμού προκύπτει από την κρυσταλλογραφία και μετράται με τη βοήθεια του προγράμματος `srd`.

Καινούρια καταχώρηση στις παραμέτρους χρειάζεται να γίνει και για τις γωνίες που περιέχουν το άτομο με το καινούριο όνομα. Στην περίπτωση των γωνιών, μας ενδιαφέρει το κεντρικό άτομο να είναι του ίδιου στοιχείου, ενώ τα άτομα εκατέρωθεν αυτού να είναι τουλάχιστον του ίδιου στοιχείου.

Όσον αφορά στις δίεδρες γωνίες θα δανειστούμε τις παραμέτρους εκείνων των συνδυασμών των ατόμων των οποίων τα δύο μεσαία άτομα είναι ίδια.

Σχόλια στο αρχείο τοπολογίας υποδεικνύονται με "!" οπουδήποτε μέσα στη γραμμή και συνήθως περιέχουν χρήσιμες πληροφορίες.

7.2 Αρχείο παραμέτρων

Αφού έχει δημιουργηθεί το αρχείο τοπολογίας, οι πληροφορίες που χρειάζεται το CHARMM για να δημιουργήσει το μόριο υπάρχουν. Το μόνο που χρειάζεται τώρα είναι να προσδιοριστούν και οι παράμετροι που είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση των ενεργειακών υπολογισμών [58]. Στην περίπτωση του CHARMM, το πρόγραμμα `namd` είναι έτσι σχεδιασμένο, ώστε να επισημαίνει στην κονσόλα ποιες παράμετροι λείπουν. Έχοντας αυτό το πλεονέκτημα μόνο καινούριες παράμετροι προστίθενται. Το αρχείο παραμέτρων προσδιορίζει τα μήκη δεσμών ισορροπίας και τις γωνίες, καθώς και τις σταθερές δεσμών και γωνιών. Παρακάτω παρατίθεται ένα απόσπασμα από το αρχείο παραμέτρων (εικόνα 20) [63].

Στο συγκεκριμένο απόσπασμα επισημαίνονται τα εξής:

- Περιέχονται όλες οι αριθμητικές τιμές που απαιτούνται για τις συναρτήσεις ενέργειας του CHARMM27. Το δυναμικό πεδίο περιέχει καταχωρήσεις για δεσμούς, γωνίες, δίεδρες και καταχρηστικές γωνίες, καθώς και για μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις. Το δυναμικό πεδίο, επίσης, περιέχει και σχόλια που εξηγούν από πού αποκτήθηκαν αυτές οι τιμές, δηλαδή είτε από πειραματικές μετρήσεις φασματοσκοπίας (spectroscopic) είτε από υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής.
- Οι καταχωρήσεις των δεσμών και των γωνιών περιέχουν στην πρώτη στήλη τους μια σταθερά η οποία μετράται σε φυσικές μονάδες των kcal/mole/Å. Η δεύτερη στήλη περιέχει το μήκος του δεσμού και τη μέτρηση της γωνίας σε Å και μοίρες (°), αντίστοιχα.
- Το επόμενο τμήμα περιέχει τις δίεδρες γωνίες.

Οι τιμές για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις είναι οι κλασικές παράμετροι VDW του πεδίου CHARMM27 που απαιτούνται για τα δυναμικά Lennard-Jones των τύπων των ατόμων [58].

BONDS

```
!V(bond) = Kb(b - b0)**2
!
!Kb: kcal/mole/A**2
!b0: A
!
!atom type Kb          b0
! Modified for CYG residue after 6-31G* geometry optimization
S    CC    240.000      1.7814 ! ALLOW    ALI SUL ION

ANGLES
!
!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
!
!V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2
!
!Ktheta: kcal/mole/rad**2
!Theta0: degrees
!Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
!S0: A
!
!atom types          Ktheta    Theta0    Kub        S0
!
! Modified for CYG residue after 6-31G* geometry optimization
CT2 S    CC    34.000      100.2000 ! ALLOW    ALI SUL ION
CT2 CC    S    50.000      114.5000 ! ALLOW    ALI SUL ION
O    CC    S    75.000      122.2000 ! ALLOW    ALI SUL ION

DIHEDRALS
!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
!
!Kchi: kcal/mole
!n: multiplicity
!delta: degrees
!
!atom types          Kchi     n    delta
CC S    CT2 CT1    0.2400  1    180.00
CC S    CT2 CT1    0.3700  3     0.00
HA CT2 S    CC     0.2800  3     0.00
CT2 S    CC CT2    2.05    2    180.00
CT2 S    CC O      2.05    2    180.00
```

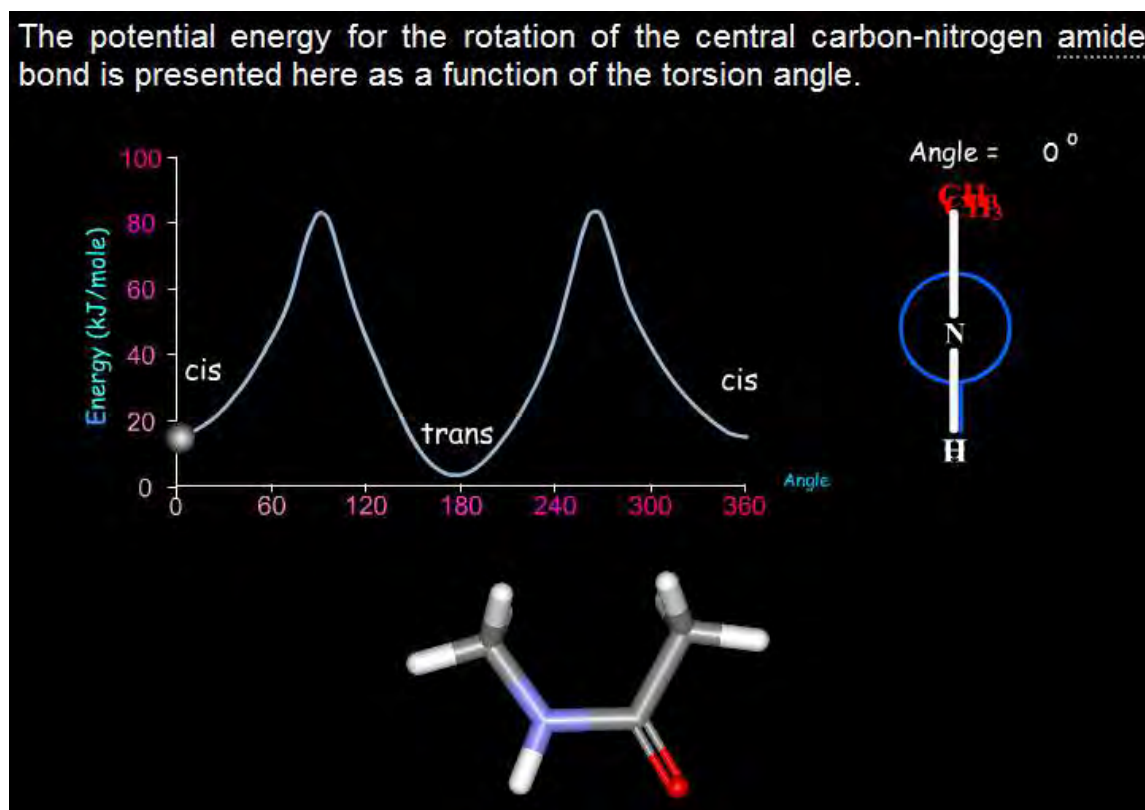
Εικόνα 20: Τμήμα του αρχείου παραμέτρων.

7.2.1 Προσδιορισμός αρχικών τιμών για τις άγνωστες παραμέτρους

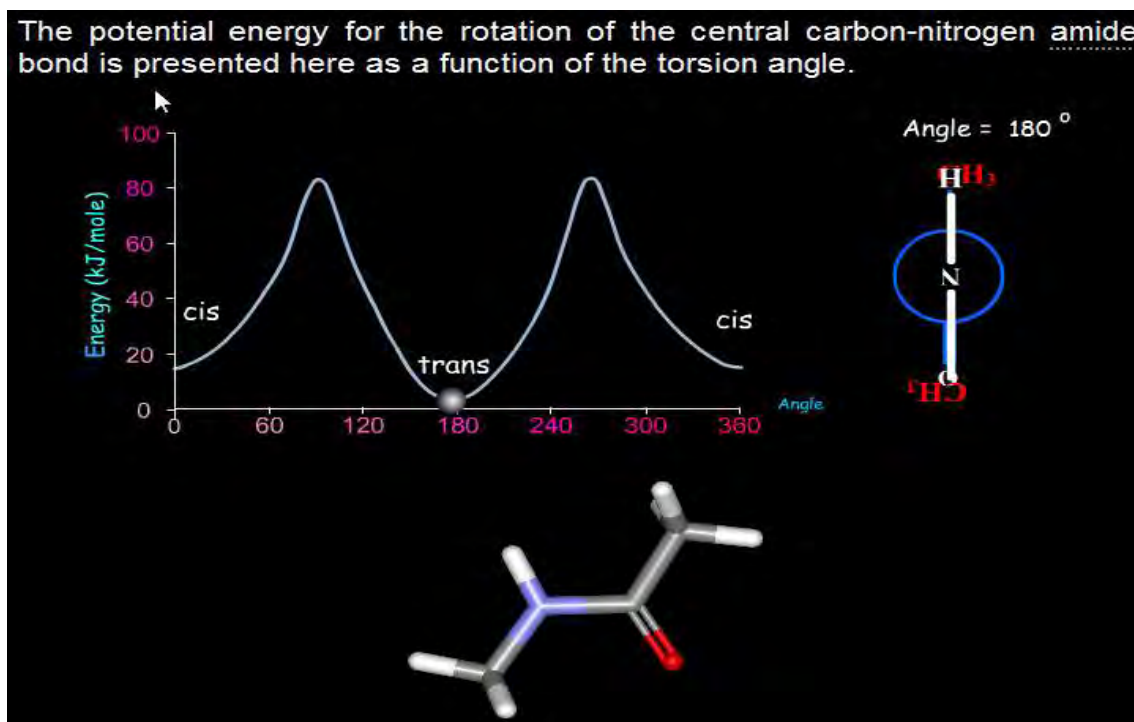
Μια ματιά στις παραμέτρους των δίδρων γωνιών

Για κάθε δίδρη γωνία πρέπει να οριστούν τρεις παράμετροι: η σταθερά K_x , η περιοδικότητα (periodicity ή multiplicity) n και η φάση δ . Η τιμή της σταθεράς υποδηλώνει το ύψος του εμποδίου στην περιστροφή γύρω από τον δεσμό μεταξύ δεύτερου και τρίτου ατόμου της δίδρης γωνίας. Συνεπώς, η σταθερά ενός διπλού δεσμού αναμένεται σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ενός απλού δεσμού. Η περιοδικότητα, n , δηλώνει τον αριθμό των κύκλων σε κάθε περιστροφή 360° . Για παράδειγμα, στην περίπτωση ενός sp^3-sp^3 δεσμού η τιμή της n θα ισούται με 3, ενώ σε ένα sp^2-sp^2 C=C δεσμό θα ισούται με 2. Η φάση, δ , υποδεικνύει τη θέση των

μεγίστων στη συνάρτηση της ενέργειας της δίδερης γωνίας, έτσι ώστε λόγω χάρη για $n=2$ τα ελάχιστα θα κυμαίνονται από 0° έως 90° και ούτω καθεξής. Τυπικά, η φάση ισούται με 0° ή 180° , αν και νέες επεκτάσεις επιτρέπουν κάθε τιμή από 0° έως 360° να αποδοθεί. Εν κατακλείδι, σε κάθε δίδερη γωνία θα πρέπει να αντιστοιχούν διάφορες τιμές περιοδικότητας, σταθερών και φάσεων.



Εικόνα 21: Απεικονίζεται μια δίδερη γωνία cis διαμόρφωσης [70].



Εικόνα 22: Απεικονίζεται μια διεδρη γωνία trans διαμόρφωσης [70].

$V_{\varphi} = k_{\varphi} [1 + (\cos (n\varphi - \delta))]$, όπου

φ : η τιμή της διεδρης γωνίας,

k_{φ} : η σταθερά,

n : η συμμετρία του στροφέα (π.χ. 3 για τις μεθυλικές ομάδες) και

δ : η φάση.

Στη συνάρτηση υπολογισμού ενέργειας στο CHARMM μπορούν να προσδιοριστούν πολλαπλές διεδρες γωνίες για τον ίδιο δεσμό. Συχνά χρειάζεται κανείς να προσδιορίσει πολλαπλές διεδρες γωνίες προκειμένου να δημιουργήσει ενεργειακά εμπόδια κατάλληλου ύψους και θέσης. Ο παρακάτω πίνακας είναι πολύ χρήσιμος για τον προσδιορισμό σωστών διεδρων γωνιών στο CHARMM [58,70].

Πίνακας 2: Αναφέρονται οι διάφοροι συνδυασμοί φάσης και περιοδικότητας και το είδος της διαμόρφωσης που επάγουν.

Dihedral Parameters in CHARMM format			
Multiplicity, n	Phase δ	Location of Minima	Useful Notes
1	0	180	yields trans conformation yields cis conformation
1	180	0	
2	0	90, 270	useful for enforcing planarity emphasizes staggered conformation of sp ³ carbons emphasizes eclipsed conformations of sp ³ carbons
2	180	0, 180	
3	0	60, 180, 300	
3	180	0, 120, 240	

8. Παραμετροποίηση με το πρόγραμμα Swissparam

Παραμετροποίηση της λινεζολίδης πραγματοποιήθηκε και με το πρόγραμμα Swissparam [64], το οποίο δημιουργήθηκε από την ομάδα μοριακού σχεδιασμού του Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής της Ελβετίας. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα παρέχει τοπολογίες και παραμέτρους για μικρές οργανικές ενώσεις, συμβατές με το πεδίο δυνάμεων CHARMM. Η διαδικασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και από το χρήστη το μόνο που απαιτείται είναι η παροχή των συντεταγμένων σε μορφή mol2. Η τοπολογία και οι παράμετροι στέλνονται στον ερευνητή με e-mail μέσα σε λίγα λεπτά.

Οι παράμετροι προέρχονται από το πεδίο δυνάμεων Merck (MMFF), όπως και τα φορτία. Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις van der Waals, λαμβάνονται από τον πλησιέστερο τύπο ατόμου του πεδίου δυνάμεων CHARMM22.

Πειραματικό μέρος

9. Αρχείο τοπολογίας

Η διαδικασία του καθορισμού της τοπολογίας της ένωσης ξεκινά με σάρωση των ήδη υπάρχοντων ενώσεων στο αρχείο τοπολογίας πρωτεϊνών, λιπιδίων, υδατανθράκων και νουκλεϊκών οξέων CHARMM27 και στο αρχείο τοπολογίας των φθοροαλκανίων, προκειμένου να βρεθούν ενώσεις ή τουλάχιστον τμήματα αυτών, που μοιάζουν με την ένωση που θέλουμε να παραμετροποιήσουμε. Με αυτόν τον τρόπο, ελαττώνεται ο αριθμός των ατόμων που πρέπει να παραμετροποιηθούν, επειδή υιοθετούνται ήδη υπάρχουσες παράμετροι, αφού τροποποιηθούν κατάλληλα. Μια σχηματική απεικόνιση της ένωσης σε ένα αρχείο WordPad, το οποίο θα περιέχει την τοπολογία της ένωσης, βοηθάει πολύ.

Στην αρχή του αρχείου τοπολογίας καθορίζεται η μάζα μόνον των καινούριων τύπων ατόμων, όπως παρατίθεται παρακάτω. Να σημειωθεί ότι η μάζα ενός στοιχείου δεν αλλάζει ανάλογα με τον τύπο των ατόμων. Για παράδειγμα, όλοι οι άνθρακες έχουν την ίδια μάζα, χωρίς να διαφοροποιείται η τιμή της ανάλογα με τον τύπο του άνθρακα κάθε φορά.

Στο τέλος του αρχείου τοπολογίας δημιουργήθηκε μια καινούρια καταχώρηση:

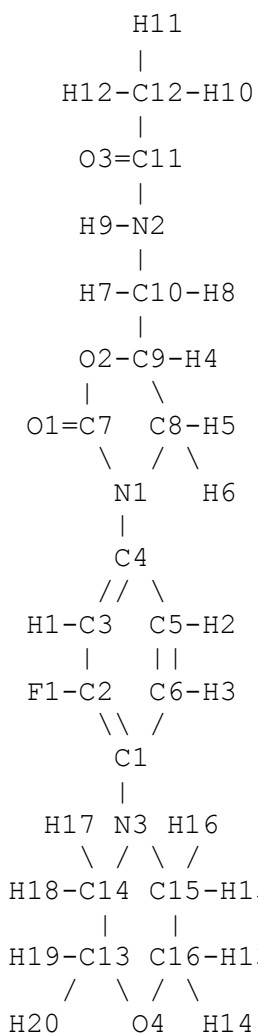
```
RESI ZLD          0.00
```

Η συντομογραφία RESI προέρχεται από τη λέξη residue και ακολουθεί το όνομα της ένωσης. Το όνομα θα πρέπει να είναι το ίδιο και στο αρχείο pdb για το οποίο θα δημιουργηθεί το αρχείο psf με την εφαρμογή psfgen, γιατί αλλιώς το πρόγραμμα θα θεωρήσει ότι δεν υπάρχει τοπολογία για τη συγκεκριμένη ένωση. Ακολουθεί το φορτίο της ένωσης, η οποία όπως φαίνεται είναι ηλεκτρικά ουδέτερη στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Να σημειωθεί ότι ένα σχήμα της ένωσης, όπως παρατίθεται στην παρακάτω εικόνα, βοηθά στην απόδοση των τύπων των ατόμων.

Τα άτομα ομαδοποιήθηκαν στις παρακάτω ομάδες, με τέτοιο τρόπο ώστε και κάθε ομάδα (GROUP) να δίνει άθροισμα φορτίων ακέραιο αριθμό, όχι απαραίτητα μηδέν, με την προϋπόθεση το ολικό φορτίο να είναι μηδέν, εφόσον πρόκειται για αφόρτιστη ένωση.

Εικόνα 23: Η απεικόνιση της λινεζολίδης.



Οι ομάδες των ατόμων, όπως περιέχονται στο αρχείο τοπολογίας είναι οι εξής:
C12, H10, H11, H12: συγκροτούν μια μεθυλική ομάδα, όπως υπάρχει λόγου χάρη στην αλανίνη και για αυτό το λόγο υιοθετήθηκαν οι τύποι των ατόμων και τα φορτία από τη μεθυλική ομάδα της αλανίνης.

C11, O3: τα συγκεκριμένα άτομα είναι ενωμένα με διπλό δεσμό, οπότε μπορούν να παραμετροποιηθούν ως άτομα ενός καρβονυλικού δεσμού, ο οποίος απαντάται σε όλα τα αμινοξέα, όπως και έγινε. Επειδή, όμως, μετά χρειάστηκε να τροποποιηθούν οι παράμετροι, ο τύπος του άνθρακα άλλαξε και του δόθηκε ένας καινούριος τύπος, ενώ όσον αφορά το φορτίο αυτού του άνθρακα, παρέμεινε το ίδιο. Αυτή η αλλαγή έγινε γιατί ο σκοπός ήταν οι αλλαγές στις παραμέτρους της λινεζολίδης να επηρεάζουν μόνο τη συγκεκριμένη ένωση και καμιά άλλη, γιατί αργότερα οι προσομοιώσεις δεν θα έδιναν αξιόπιστα αποτελέσματα, αφού θα είχαν αλλάξει οι παράμετροι για τις πρωτεΐνες του ριβοσώματος.

N2, H9, C10, H7, H8: η συγκεκριμένη ομάδα ατόμων είναι όμοια με την τοπολογία του αζώτου που συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό.

C9, H4, O2, C8, H5, H6: πανομοιότυπη δομή δεν υπήρχε στο αρχείο τοπολογίας και βάση ομοιότητας ο C9 είναι τύπου CT1, καθώς συνδέεται με δυο άνθρακες, ένα υδρογόνο και ένα ηλεκτραρνητικό στοιχείο όπως είναι το άζωτο.

C7, O1, N1: ακριβώς ίδια τοπολογία ατόμων δεν υπήρχε και βάση ομοιότητας η πιο κοντινή τοπολογία απαντά στη θυμίνη, καθώς ο άνθρακας ενώνεται με διπλό δεσμό με οξυγόνο, με απλό με ένα άζωτο και αν και θα έπρεπε να ενώνεται με οξυγόνο ενώνεται με άζωτο, που είναι επίσης ηλεκτραρνητικό στοιχείο και ως εκ τούτου χημικά οι δυο δομές μοιάζουν πάρα πολύ.

C3, C4, H1, C2, F1, C1, C6, H3, C5, H2: τα ονόματα των συγκεκριμένων ατόμων προέρχονται από έναν βενζολικό δακτύλιο, ενώ οι τύποι του φθορίου και του άνθρακα με τον οποίο αυτό ενώνεται προέρχονται από τα φθοροαλκάνια.

N3, C14, H17, H18, C13, H19, H20, O4, C16, H13, H14, C15, H15, H16: τα συγκεκριμένα άτομα συγκροτούν τον δακτύλιο της μορφολίνης, όλα τα υδρογόνα και όλοι οι άνθρακες είναι ίδιου τύπου.




Στη συνέχεια, παραθέτονται όλοι οι δεσμοί της ένωσης οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ διαδοχικών ατόμων, παραθέτονται δηλαδή όλες οι ομάδες 2 ατόμων που συνδέονται με απλό δεσμό.

Στη συνέχεια, καταχωρούνται οι καταχρηστικές γωνίες (improper), η καθεμία εκ των οποίων αντιστοιχεί σε μια τετράδα ατόμων.

Αμέσως μετά παραθέτονται οι γωνίες και στο τέλος παρατίθενται οι εσωτερικές συντεταγμένες, οι οποίες υπολογίζονται με το πρόγραμμα spdbv, η γραμμή εργασιών του οποίου φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



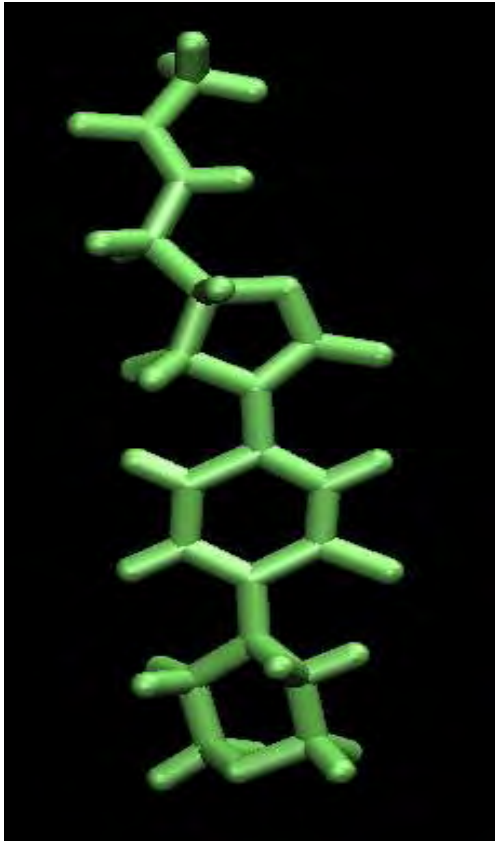
Εικόνα 24: Η γραμμή εργασιών του spdbv [66].

Συγκεκριμένα, με το πέμπτο κουμπί () μετράται το μήκος των δεσμών, ενώ με το έκτο () η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ 3 ατόμων επιλέγοντας πρώτα το κεντρικό άτομο. Τέλος, ενώ πατάμε *Ctrl*, πατάμε το έβδομο κουμπί () και επιλέγουμε με τη σειρά τα 4 άτομα. Με αυτό τον τρόπο μετρώνται και οι διέδρες γωνίες. Βοηθάει πολύ η εμφάνιση των ονομάτων των ατόμων που επιτυγχάνεται ακολουθώντας την παρακάτω διαδρομή: Window > Control Panel > label και Display > Label Kind > Atom Name.

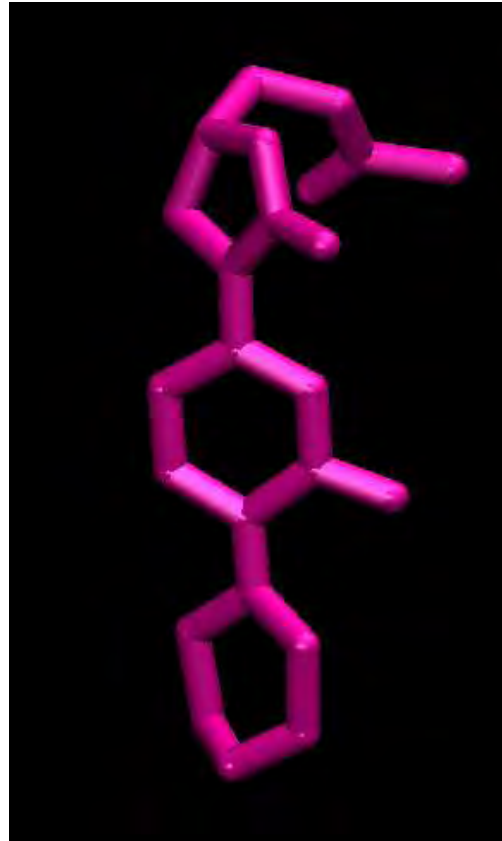
10. Αρχείο παραμέτρων

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν οι παράμετροι της λινεζολίδης, οι οποίες αναφέρονται σε τύπους ατόμων πλέον και όχι ονομαστικά στα άτομα. Κάθε καταχώρηση στο πεδίο των δεσμών περιλαμβάνει στην πρώτη και δεύτερη στήλη τους τύπους των ατόμων που σχηματίζουν το δεσμό, στην τρίτη στήλη τη σταθερά του δεσμού και στην τέταρτη στήλη το μήκος του δεσμού. Όσον αφορά τις καταχωρήσεις των γωνιών, οι τρεις πρώτες στήλες περιλαμβάνουν τους τύπους των ατόμων που σχηματίζουν τη γωνία, η τέταρτη στήλη τη σταθερά της γωνίας και η τελευταία στήλη αναφέρει την τιμή της γωνίας σε μοίρες. Οι καταχωρήσεις των διέδρων γωνιών περιλαμβάνουν στις τέσσερις πρώτες στήλες τους τύπους των ατόμων που σχηματίζουν τη διέδρη γωνία, η πέμπτη στήλη αναφέρει τη σταθερά της γωνίας, η επόμενη στήλη την περιοδικότητα και η τελευταία τη φάση της γωνίας.

Οι παράμετροι που δημιουργήθηκαν δίνουν την κρυσταλλική δομή της λινεζολίδης σε ελεύθερη μορφή, όπως αποκτήθηκε από την κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων του Cambridge [67], αν και οι συντεταγμένες του αρχείου για το οποίο δημιουργήθηκε το αρχείο psf της λινεζολίδης προέρχονταν από την κυρτωμένη δομή της λινεζολίδης, όταν είναι προσδεμένη στην 50S υπομονάδα του *H. marismortui*. Δηλαδή, η εξισορρόπηση της κυρτωμένης δομής κατάφερε να αποδώσει την ελεύθερη κρυσταλλική δομή. Τα βήματα μιας προσομοίωσης παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

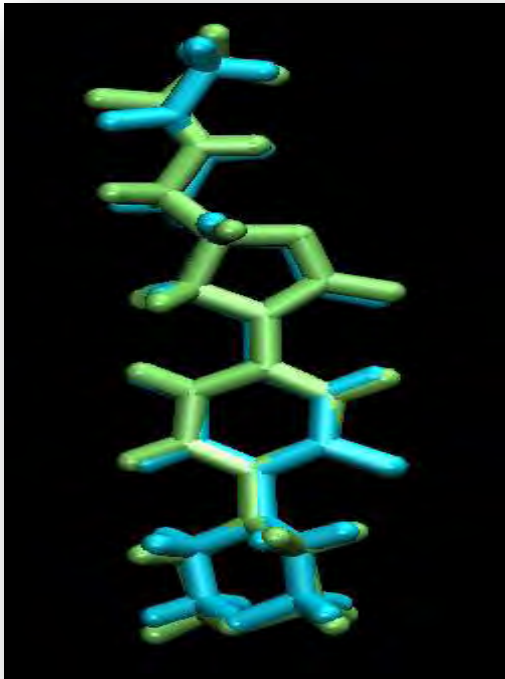


Εικόνα 25: Η εξισορροπημένη ελεύθερη δομή.



Εικόνα 26: Η κρυσταλλική δομή από το *Haloarcula marismortui*.

Η εξισορροπημένη δομή διαφέρει ελάχιστα από την ελεύθερη κρυσταλλική μορφή.



Εικόνα 27: Η εξισορροπημένη δομή συγκρινόμενη με την ελεύθερη κρυσταλλική μορφή (RMSD=0.69)

11. Τα βήματα των προσομοιώσεων για την ελεύθερη λινεζολίδα

11.1 Δημιουργία αρχείου psf

Το αρχείο pdb για το οποίο δημιουργήθηκε ένα αρχείο psf είναι τμήμα του 3CPW.pdb, το οποίο απεικονίζει τη λινεζολίδα προσδεμένη στην 50S υπομονάδα του *H. marismortui*. Στη συνέχεια, δημιουργήσαμε ένα pdb που περιείχε μόνο τις συντεταγμένες του αντιβιοτικού. Από τη δομή, όπως ήταν αναμενόμενο, έλειπαν τα υδρογόνα. Για αυτό τον λόγο, πρέπει να έχουμε ένα νέο τόσο αρχείο pdb όσο και ένα αρχείο psf, τα οποία μπορούμε να τα αποκτήσουμε με το psfgen. Η διαδικασία είναι η εξής:

- ☀ Τρέχουμε το psfgen με διπλό κλικ. Ανοίγει η κονσόλα του προγράμματος.
- ☀ Η διαδικασία γίνεται με τη βοήθεια ενός script, ενός αρχείου δηλαδή txt που συντάσσουμε εμείς ή βρίσκουμε στη βιβλιογραφία και το τροποποιούμε όπου χρειάζεται. Αφού κάνουμε τις απαραίτητες αλλαγές στο script, όνομα του αρχείου pdb που διαβάζει και το αρχείο τοπολογίας, το κάνουμε αντιγραφή-επικόλληση στην κονσόλα του προγράμματος.

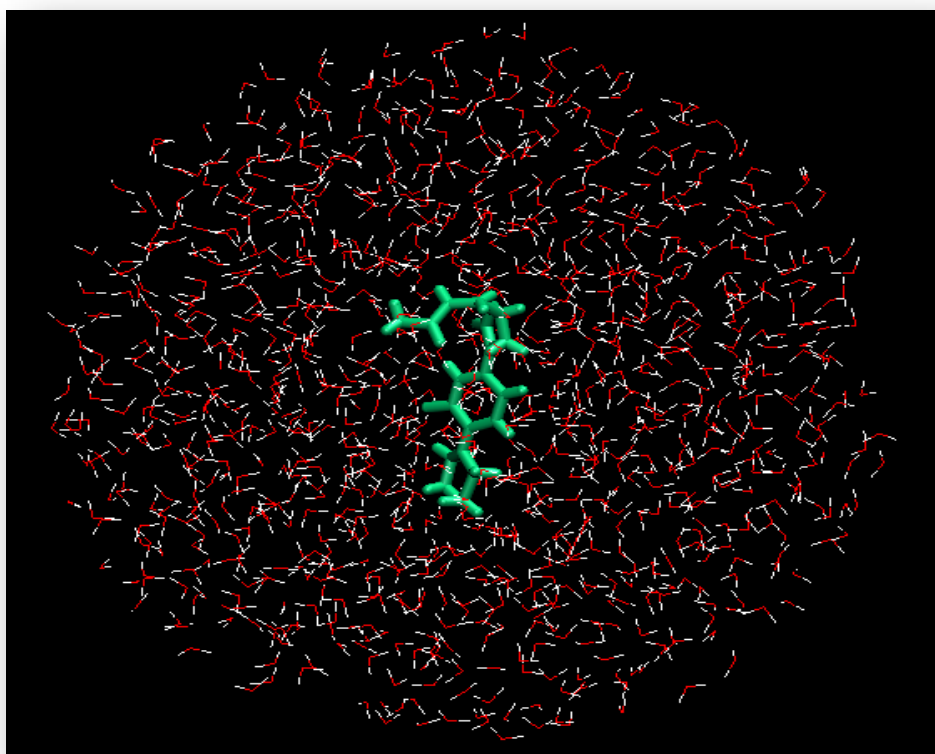
11.2 Ενυδάτωση

Στη συνέχεια, προσθέσαμε νερό στο σύμπλοκο, ώστε οι συνθήκες να πλησιάζουν τις πραγματικές. Συγκεκριμένα, δημιουργήσαμε μια σφαίρα νερού. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσα περισσότερα νερά προσθέτουμε, τόσο πιο αργή γίνεται η προσομοίωση. Η ενυδάτωση γίνεται με τη βοήθεια ενός script και του προγράμματος vmd.

- 1) Φορτώνουμε το μόριο: VMD Main > File > New Molecule.
 - α) Στο παράθυρο Molecular File Browser φορτώνουμε το αρχείο psf.
 - β) Στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που ανοίξαμε και επιλέγουμε Load Data Into Molecule. Διαλέγουμε το αρχείο pdb που προέκυψε από το psfgen.
- 2) Ανοίγουμε το script του solvate και ορίζουμε τα ονόματα των αρχείων psf και pdb που θα διαβάσει, καθώς επίσης και τα ονόματα των νέων αρχείων psf και pdb.
- 3) Πηγαίνουμε στην κονσόλα του VMD από τη διαδρομή: Extensions > Tk Console.
 - α) Για να μπούμε στο φάκελο που έχουμε αποθηκευμένα τα αρχεία pdb και psf και το script του solvate πληκτρολογούμε: `cd <<το path του φακέλου εργασίας>>`

β) Για να τρέξουμε το script πληκτρολογούμε `play solvate_script.txt`. Αν δεν τρέξει, δίνουμε την εντολή `play {solvate_script.txt}`.

3) θα δημιουργηθούν 3 νέα αρχεία, τα αρχεία `pdb` και `psf` και ένα αρχείο `txt` που θα λέει ότι έγινε επιτυχώς η διαλυτοποίηση. Επιπλέον, αποθηκεύουμε τις δύο τελευταίες σειρές που εμφανίζονται στην κονσόλα και δίνουν τις συντεταγμένες του κέντρου της σφαίρας και της ακτίνας της.



Εικόνα 28: Το λινεζολίδιο σε μια σφαίρα νερού.

11.3 Προσθήκη ιόντων

Ιόντα θα πρέπει να προστεθούν για να εξασφαλιστεί η ηλεκτρική ουδετερότητα του συστήματος. Τα ιόντα αυτά θα προστατεύουν τις περιοχές του συστήματος που φέρουν φορτίο και θα κάνουν όλο το σύστημα πιο σταθερό. Είναι ιδιαίτερα απαραίτητα όταν το σύστημα που μελετάται φέρει σημαντικό ηλεκτρικό φορτίο. Σε μια τέτοια περίπτωση, ο αριθμός των ιόντων θα επιλεγεί έτσι, ώστε το σύστημα μετά την προσθήκη τους να καθίσταται ουδέτερο. Προκειμένου να τρέξει αυτό το βήμα, χρειάζεται το αρχείο `math.tcl`. η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1) Φορτώνουμε το μόριο: `VMD Main > File > New Molecule`.

α) Στο παράθυρο `Molecular File Browser` φορτώνουμε το αρχείο `psf` που προέκυψε από τη διαλυτοποίηση.

β) Στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που ανοίξαμε και επιλέγουμε Load Data Into Molecule. Διαλέγουμε το αρχείο pdb που επίσης προέκυψε από τη διαλυτοποίηση.

Πλέον βλέπουμε να απεικονίζεται η πρωτεΐνη σε τρεις διαστάσεις στο VMD OpenGL Display.

2) Στο μενού ακολουθούμε τη διαδρομή: *Extensions > Modeling > Add Ions*

3) Στο παράθυρο Autoionize που άνοιξε:

A) παρατηρούμε ότι στο Input βρίσκονται ήδη τα αρχεία psf και pdb

B) Ορίζουμε τα ονόματα που θα έχουν τα νέα αρχεία psf και pdb στο πεδίο «Output prefix».

Γ) μπορούμε επίσης αντί για προσθήκη ιόντων Na, να επιλέξουμε προσθήκη ιόντων K.

4) Επιλέγουμε: << Autoionize >>.

5) Τα δύο νέα αρχεία psf και pdb που έχουν δημιουργηθεί βρίσκονται αποθηκευμένα αν όχι στο φάκελο στον οποίο εργαζόμαστε, τότε στο φάκελο που βρίσκεται αποθηκευμένο το πρόγραμμα VMD.

Υπάρχει και δεύτερος τρόπος, με το κατάλληλο script.

Μετακίνηση ιόντων

Υπάρχει περίπτωση τα ιόντα να μην τοποθετηθούν συμμετρικά του μορίου, όπως και έγινε. Αυτό μπορεί να εμποδίσει τη σωστή εξισορρόπηση του μορίου. Για αυτό τον λόγο, μπορούμε να μετακινήσουμε κάποια ιόντα, έτσι ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο συμμετρικά τοποθετημένα. Αυτό μπορεί να γίνει με τη βοήθεια του προγράμματος VMD.

1. Φορτώνουμε το μόριο: *VMD Main > File > New Molecule*.

α) Στο παράθυρο Molecular File Browser φορτώνουμε το αρχείο psf που προέκυψε από τη διαλυτοποίηση.

β) Στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που ανοίξαμε και επιλέγουμε Load Data Into Molecule. Διαλέγουμε το αρχείο pdb που επίσης προέκυψε από την προσθήκη ιόντων.

2. Στο μενού ακολουθούμε τη διαδρομή: *Graphics > Representations*.

3. Στο παράθυρο Graphical Representations που άνοιξε, πηγαίνουμε στην καρτέλα Selections και εκεί δημιουργούμε ένα layer στο οποίο θα φαίνονται μόνο το μόριο που μελετάμε και τα ιόντα. Τέλος, Apply.

4. Πλέον, στο VMD OpenGL Display βλέπουμε το μόριο και πώς είναι τοποθετημένα γύρω του τα ιόντα.

5. Στο μενού του *VMD Main* ακολουθούμε τη διαδρομή: *Mouse > Move > Residue*.
Η συγκεκριμένη επιλογή, δηλαδή του καταλοίπου, συμπίπτει με αυτή του ιόντος, αφού πρόκειται για απλά στοιχεία.
6. Τώρα μπορούμε στο *VMD OpenGL Display* να μετακινήσουμε οποιοδήποτε ιόν με τον δείκτη του ποντικιού.
7. Μόλις τελειώσουμε, για να το αποθηκεύσουμε, στο μενού του *VMD Main* ακολουθούμε τη διαδρομή: *File > Save Coordinates*.
Πρέπει προηγουμένως να έχουμε επιλέξει και τα μόρια του νερού που αφαιρέσαμε.

11.4 Ελαχιστοποίηση ενέργειας

Πριν την εξισορρόπηση πρέπει πρώτα να ελαχιστοποιήσουμε την ενέργεια του συστήματος.

1. Για να τρέξουμε την ελαχιστοποίηση πρέπει να φτιάξουμε ένα script, το οποίο θα είναι τύπου txt.

Σε αυτό θα καθορίζονται οι συνθήκες στις οποίες θα γίνει η διαδικασία αλλά και τα αρχεία που θα διαβάσει, καθώς επίσης και το αρχείο παραμέτρων, το οποίο θα είναι τύπου .inp. Πρέπει να προσέξουμε όλα αυτά να περιέχονται στον φάκελο εργασίας που βρίσκεται και το script. Στο πεδίο coordinates βάζουμε το αρχείο pdb που προέκυψε από την προσθήκη ιόντων, ενώ στο πεδίο structure το αντίστοιχο psf. Στη συνέχεια, ορίζουμε το όνομα του αρχείου που θα προκύψει στο πεδίο output name.

2. Το πρόγραμμα που θα επεξεργαστεί όλες αυτές τις πληροφορίες είναι το NAMD. Συγκεκριμένα, θα χρειαστούμε τις εφαρμογές namd2 και tcl85.dll. Είναι πολύ μικρά αρχεία, τα οποία μπορούμε να συμπεριλάβουμε στον φάκελο εργασίας.

3. Για να τρέξουμε την ελαχιστοποίηση, ανοίγουμε το τερματικό των windows (γραμμή εντολών ή command line) και δίνουμε την παρακάτω εντολή:
cd «το path του φακέλου».

Είναι προτιμότερο και πρακτικότερο ο φάκελος να βρίσκεται αποθηκευμένος στον ελεύθερο χώρο του σκληρού δίσκου και όχι σε φακέλους του λειτουργικού συστήματος των windows, γιατί είναι πιθανό να μην εισαχθεί σωστά το path του φακέλου.

```
>>> namd2.exe +p2 script_minimization.txt > log_minimization.txt
```

Η παραπάνω εντολή ορίζει: ποιο πρόγραμμα θα χρησιμοποιηθεί, πόση επεξεργαστική ισχύ θα χρησιμοποιήσει (στο παράδειγμα έχει οριστεί να

χρησιμοποιήσει 2 επεξεργαστές), το όνομα του script που θα διαβάσει το πρόγραμμα (προσοχή ώστε να είναι ακριβώς το ίδιο γραμμένο, γιατί είναι ευαίσθητο στην αναγνώριση πεζών-κεφαλαίων και συμβόλων) και τέλος το αρχείο log, το οποίο θα μας δείξει την πορεία της διαδικασίας.

4. Μόλις δώσουμε αυτή την εντολή θα δημιουργηθεί στον φάκελο εργασίας το αρχείο log_minimization που ζητήσαμε. Είναι ένα αρχείο το οποίο ενημερώνεται περιοδικά κατά τη διάρκεια της ελαχιστοποίησης και το οποίο μπορούμε να ανοίξουμε οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της ελαχιστοποίησης και κυρίως μπορούμε να παρακολουθούμε τη στήλη gradient tolerance. Θα έχουμε μια ικανοποιητική ελαχιστοποίηση του συστήματος, όταν αυτός ο δείκτης είναι μονοψήφιος και όσο το δυνατόν μικρότερος, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί αυξάνοντας τα βήματα. Το συγκεκριμένο αρχείο μας ενημερώνει επίσης και για το πόσο θα διαρκέσει η προσομοίωση.
5. Όταν τελειώσει η διαδικασία, θα δημιουργηθούν 3 νέα αρχεία τύπου: .coor, .vel, .xsc, με όνομα αυτό που ορίσαμε ως output name στο script της ελαχιστοποίησης.
Το αρχείο .coor θα το χρησιμοποιήσουμε αργότερα στην εξισορρόπηση.

11.5 Εξισορρόπηση

Είναι η καθαυτό προσομοίωση μοριακής δυναμικής, στην επίτευξη της οποίας αποσκοπούσε η παραπάνω διαδικασία. Εκτελείται από το NAMD και έχει την ίδια φιλοσοφία με την ελαχιστοποίηση.

1. Για να τρέξουμε την εξισορρόπηση πρέπει να φτιάξουμε ένα script, το οποίο θα είναι τύπου txt.

Σε αυτό θα καθορίζονται οι συνθήκες στις οποίες θα γίνει η διαδικασία, αλλά και τα αρχεία που θα διαβάσει, καθώς επίσης και ένα αρχείο παραμέτρων τύπου .inp. Στο πεδίο coordinates βάζουμε το αρχείο .coor που προέκυψε από την ελαχιστοποίηση, ενώ στο πεδίο structure το αντίστοιχο psf που προέκυψε από την προσθήκη ιόντων. Σε κάποια script στο πεδίο coordinates βάζουμε το αρχείο pdb που προέκυψε από την προσθήκη ιόντων και το αρχείο .coor που προέκυψε από την ελαχιστοποίηση το βάζουμε στο πεδίο *bincoordinates*. Πρέπει να προσέξουμε όλα τα αρχεία να περιέχονται στο φάκελο εργασίας. Στη συνέχεια, ορίζουμε το όνομα του αρχείου που θα προκύψει στο πεδίο output name.

Πρέπει να προσέξουμε το είδος των boundary conditions, δηλαδή αν εξισορροπούμε την πρωτεΐνη σε σφαίρα, κύλινδρο ή κύβο, διότι αλλάζουν οι συντεταγμένες που πρέπει να οριστούν σε κάθε περίπτωση.

Συνήθως στα περισσότερα script συναντούμε το πεδίο *fixed atoms*, το οποίο μας επιτρέπει να κρατήσουμε όσα άτομα του μορίου θέλουμε ακίνητα. Στο πεδίο αυτό βάζουμε ένα αρχείο pdb, το οποίο θα έχει κατάληξη .ref. Αυτό το αρχείο είναι ένα αρχείο pdb, το οποίο στην προτελευταία στήλη του αντί για 0 έχει 1 σε όσα άτομα θέλουμε να κρατηθούν ακίνητα κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης.

Συνήθως, στο τέλος του script πριν δώσουμε τον αριθμό των βημάτων, υπάρχει η επιλογή «minimize». Αυτή η ελαχιστοποίηση δεν είναι απαραίτητη αυτή τη στιγμή και για αυτό το λόγο την απενεργοποιούμε βάζοντας μπροστά από την εντολή μια "#".

2. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, το πρόγραμμα που θα επεξεργαστεί όλες αυτές τις πληροφορίες είναι το NAMD. Και εδώ θα χρειαστούμε τις εφαρμογές namd2 και tcl85.dll.
3. Για να τρέξουμε την εξισορρόπηση, δίνουμε την εντολή:

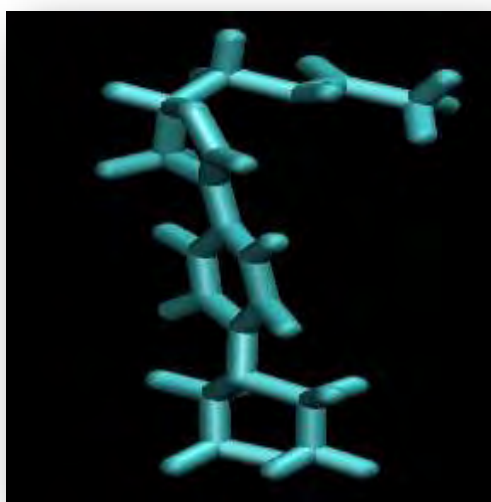
```
>>> namd2.exe +p2 script_equilibration.txt > log_equilibration.txt
```
4. Μόλις δώσουμε την εντολή, θα δημιουργηθεί στον φάκελο το αρχείο log_equilibration.txt, το οποίο μπορούμε να ανοίξουμε οποιαδήποτε στιγμή και να ενημερωθούμε για τη διαδικασία.
5. Όταν τελειώσει η εξισορρόπηση, θα δημιουργηθούν 4 νέα αρχεία τύπου: .dcd, .coor, .vel και .xsc και 6 αρχεία τύπου: .restart.xsc.old, .restart.xsc, .restart.vel.old, .restart.vel, .restart.coor.old, .restart.coor, με όνομα αυτό που ορίσαμε ως output name στο script.



Εικόνα 29: Η ελαχιστοποιημένη (κίτρινο χρώμα) και η εξισορροπημένη (πράσινο χρώμα) δομή.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψαν μετά από εργασία κάποιων μηνών. Είναι, όμως, συγκρίσιμα με αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν όταν η παραμετροποίηση έγινε από το πρόγραμμα Swissparam, η τοπολογία και οι παράμετροι των οποίων, καθώς και τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων παρατίθενται παρακάτω. Τα script που χρησιμοποιήθηκαν είναι ακριβώς τα ίδια, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα.

Η δομή που προέκυψε μετά την εξισορρόπηση της λινεζολίδης σε μια σφαίρα νερού είναι η εξής:



Εικόνα 30: Η εξισορροπημένη δομή που προέκυψε από την παραμετροποίηση του προγράμματος Swissparam.

12. Τα βήματα των προσομοιώσεων για το σύστημα 50S-λινεζολίδα

Εφόσον επιτεύχθηκε η απόδοση της κρυσταλλικής δομής, εκτελέστηκαν και οι προσομοιώσεις της λινεζολίδης σε σύμπλοκο με την 50S υπομονάδα. Όσον αφορά την ριβοσωματική υπομονάδα, επειδή δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη πειραματικά η δομή της 50S υπομονάδας του σταφυλόκοκκου, στις προσομοιώσεις χρησιμοποιήθηκε η 50S υπομονάδα του *Escherichia coli*, το οποίο φυλογενετικά είναι πολύ κοντά με το σταφυλόκοκκο. Να σημειωθεί ότι οι μέχρι τώρα κρυσταλλογραφικές μελέτες που αφορούσαν το λινεζολίδιο έγιναν με το αρχαίο *Haloarcula marismortui* και το πολύ μακρινό φυλογενετικά βακτήριο *Deinococcus radiodurans*. Συνεπώς, η μελέτη της λινεζολίδης με το βακτήριο *Escherichia coli* δεν έχει παρά να φωτίσει τις αλληλεπιδράσεις του αντιβιοτικού με το ριβόσωμα.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το pdb της 50S υπομονάδας από *E.coli* με κωδικό 2AW4. Επειδή, όμως, το αρχείο pdb περιέχει παραπάνω από μια αλυσίδες πρέπει να τροποποιήσουμε το παραπάνω script, ώστε να περιέχονται όλες οι αλυσίδες. Το παραπάνω script περιέχει μόνο μια αλυσίδα, την αλυσίδα A. Πρώτα από όλα, θα πρέπει κάθε αλυσίδα να βρίσκεται σε διαφορετικό αρχείο pdb, καθένα από τα οποία θα ορίζεται στο script.

Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ενυδατώθηκε. Το τρίτο βήμα, η προσθήκη ιόντων, δεν έγινε επειδή λόγω του ό,τι το φορτίο του ριβοσώματος είναι πολύ αρνητικό θα έπρεπε να προστεθούν πάρα πολλά ιόντα σε ένα λεπτό φλοιό νερού. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας και τέλος η εξισορρόπηση. Επειδή όμως μια εξισορρόπηση δεν ήταν αρκετή, οι εξισορροπήσεις συνεχίστηκαν.

Συνέχιση εξισορρόπησης

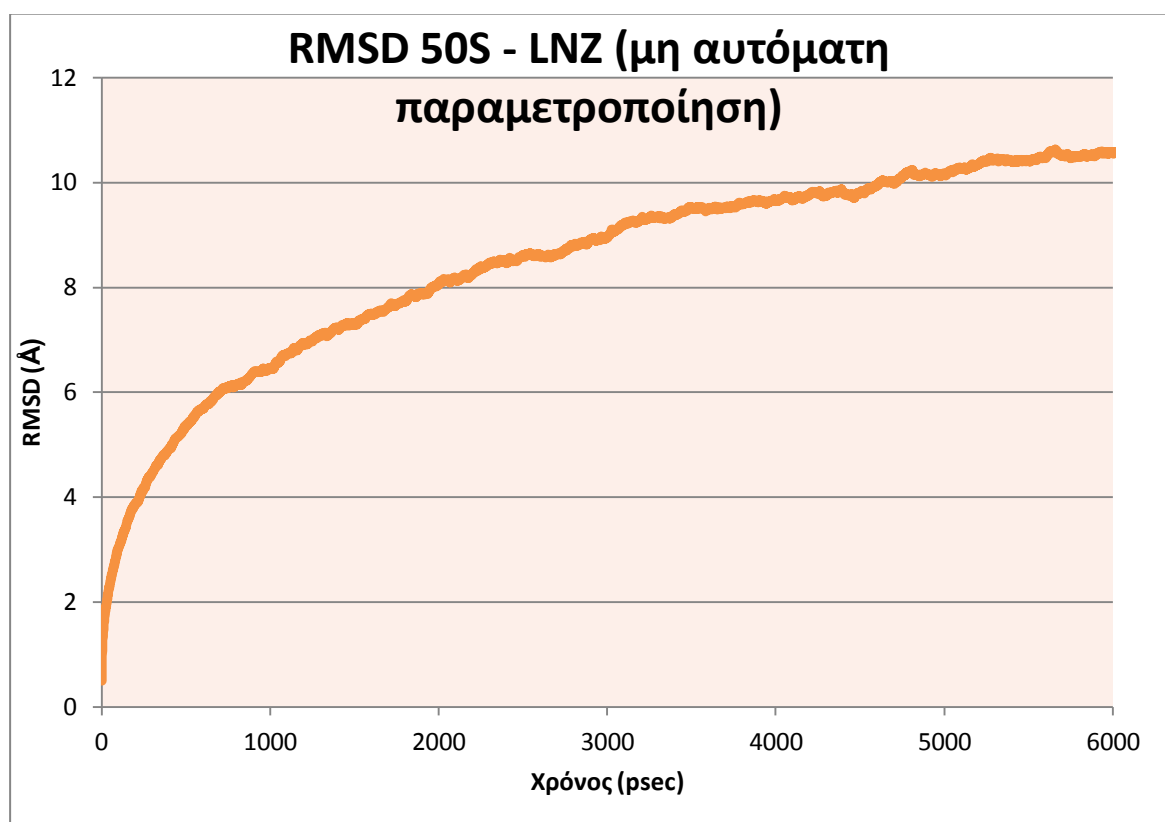
Τις περισσότερες φορές μια εξισορρόπηση δε φτάνει για να εξισορροπηθεί εντελώς το σύστημα και πρέπει να ακολουθήσουν και άλλες μετά την πρώτη. Η διαδικασία είναι η ίδια σε γενικές γραμμές, με κάποιες διαφορές στο script, οι οποίες είναι οι εξής:

1. Αντί για ένα αρχείο .pdb αυτή τη φορά στο πεδίο coordinates θα φορτώσουμε το αρχείο .coor που προέκυψε από την τελευταία εξισορρόπηση. Όμως, είναι ένα binary αρχείο. Ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία, η οποία θα γίνει με τη βοήθεια του VMD και κατά συνέπεια είναι ίδια στα Linux και στα Windows και με την οποία θα μετατρέψουμε το αρχείο .coor σε αρχείο pdb:
 - α) Φορτώνουμε το μόριο: VMD Main > File > New Molecule. Στο παράθυρο Molecular File Browser φορτώνουμε το αρχείο psf που προέκυψε από την προσθήκη ιόντων και αυτό που χρησιμοποιούμε στην εξισορρόπηση.
 - β) Στο VMD Main κάνουμε δεξί κλικ στο μόριο που ανοίξαμε και επιλέγουμε Load Data Into Molecule. Στο πεδίο Determine file type επιλέγουμε από τη λίστα NAMD Binary Coordinates και κατόπιν φορτώνουμε το αρχείο .coor που προέκυψε από την τελευταία εξισορρόπηση.
 - γ) Τέλος το αποθηκεύουμε: File > Save Coordinates. Στο πεδίο Save Trajectory: στο πεδίο Selected atoms διαλέγουμε all. Στο πεδίο File Type διαλέγουμε pdb και τέλος Save.
2. Στο script της εξισορρόπησης ενεργοποιούμε την εντολή «minimize» αφαιρώντας τη "#", γιατί πριν τη νέα εξισορρόπηση δεν έχει προηγηθεί άλλη ελαχιστοποίηση ενέργειας και έστω και λίγα βήματα, π.χ. 100, είναι αρκετά.

Αποτελέσματα

13. Αποτελέσματα μη αυτόματης παραμετροποίησης

Η τελική δομή προέκυψε μετά από εξισορρόπηση 6 ns και μια ελαχιστοποίηση της εξισορροπημένης δομής 1000 βημάτων. Μία προσομοίωση θεωρείται επιτυχής όταν το RMSD (τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης) παύει να μεταβάλλεται συστηματικά και εμφανίζει μόνο στατιστικές διακυμάνσεις. Το RMSD του συστήματος παρατίθεται στην εικόνα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 1 : Το RMSD του συστήματος 50S-λινεζολίδης που προέκυψε από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση.

Το RMSD υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$Rmsd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{atoms}} d_i^2}{N_{atoms}}}$$

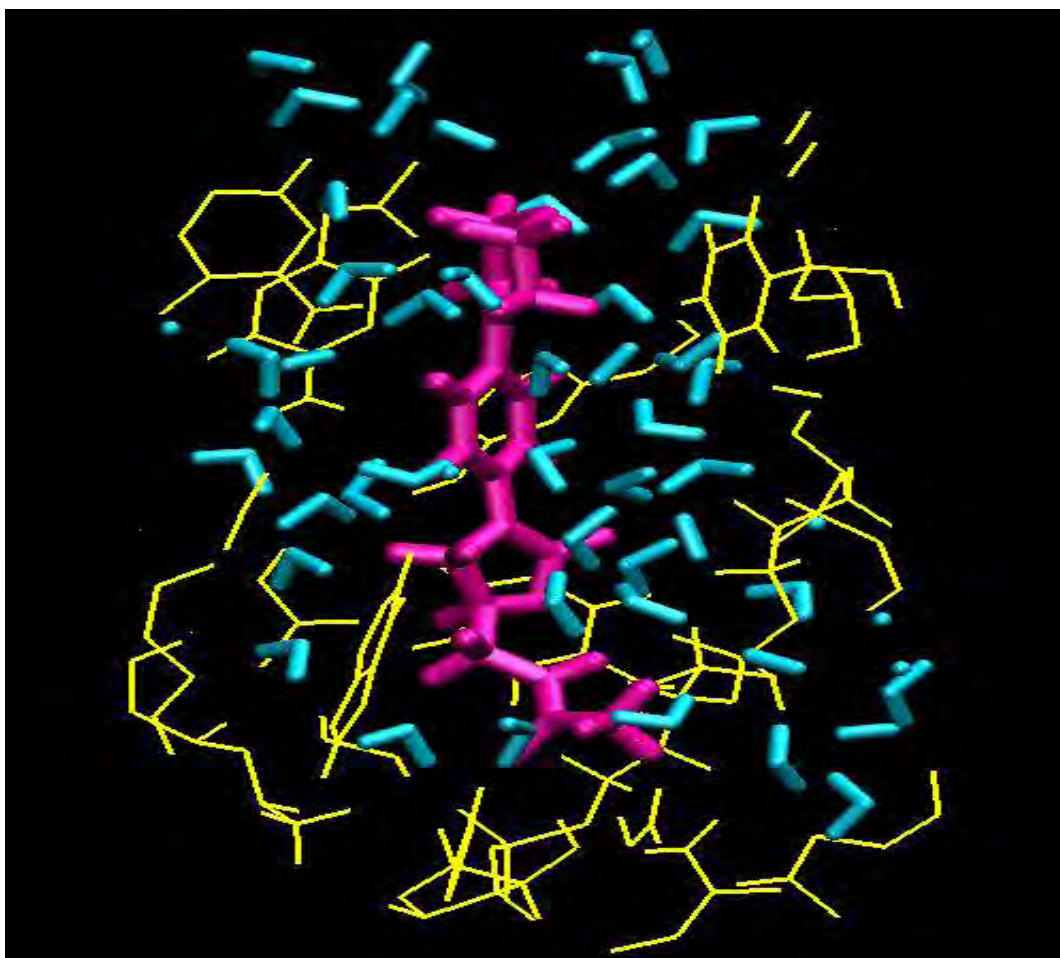
όπου d_i^2 είναι το τετράγωνο της απόστασης μεταξύ των συντεταγμένων των ατόμων i μεταξύ της δομής κατά τη χρονική στιγμή t και της αρχικής [78]. Σε κάθε βήμα αυτές οι δομές είναι διαφορετικές, αλλά πάντα διαδοχικές. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μικρότερη τιμή RMSD υπολογίζεται, μετά από βέλτιστη υπέρθεση των δύο δομών [29].

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 3000 psec το RMSD συνεχώς αυξάνεται. Στα επόμενα 3000 psec, η μεταβολή του RMSD είναι πολύ μικρότερη και φαίνεται ότι μετά τα 4000 psec αρχίζει να σταθεροποιείται η μεταβολή που είναι πλέον της τάξης του 1 Å.

Παρατηρώντας τη λινεζολίδη μέσα στον θύλακα όπου προσδέεται, βλέπουμε την έντονη παρουσία μορίων νερού και την κάμψη που έχει υποστεί σε σύγκριση με την ελεύθερη κρυσταλλική μορφή. Αξίζει να σημειωθεί η απουσία πρωτεϊνών στην άμεση γειτονιά του αντιβιοτικού επιβεβαιώνοντας ότι στόχος της λινεζολίδης είναι κατάλοιπα του 23S rRNA. Συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα του rRNA με τα οποία αλληλεπιδρά είναι:

- | | |
|------------|---------------|
| ✓ ADE2503, | ✓ ADE2451, |
| ✓ URA2504, | ✓ GUA2061, |
| ✓ GUA2505, | ✓ CYT2452 και |
| ✓ URA2506, | ✓ ADE2572. |
| ✓ GUA2447, | |

Αναλυτικότερα, η ακεταμιδική ουρά αλληλεπιδρά με άτομα των καταλοίπων URA2504, GUA2061, ADE2503 και GUA2505, ενώ ο πρώτος δακτύλιος γειτονεύει με τα κατάλοιπα URA2504, GUA2505 και GUA2447. Όσον αφορά τα άτομα του δεύτερου δακτυλίου, η άμεση γειτονιά τους αποτελείται από άτομα των καταλοίπων ADE2572 και GUA2505. Συγκεκριμένα, το φθόριο αλληλεπιδρά με το H2 του ADE2572. Τέλος, ο τρίτος δακτύλιος γειτονεύει με τα κατάλοιπα CYT2452, URA2506 και ADE2451.

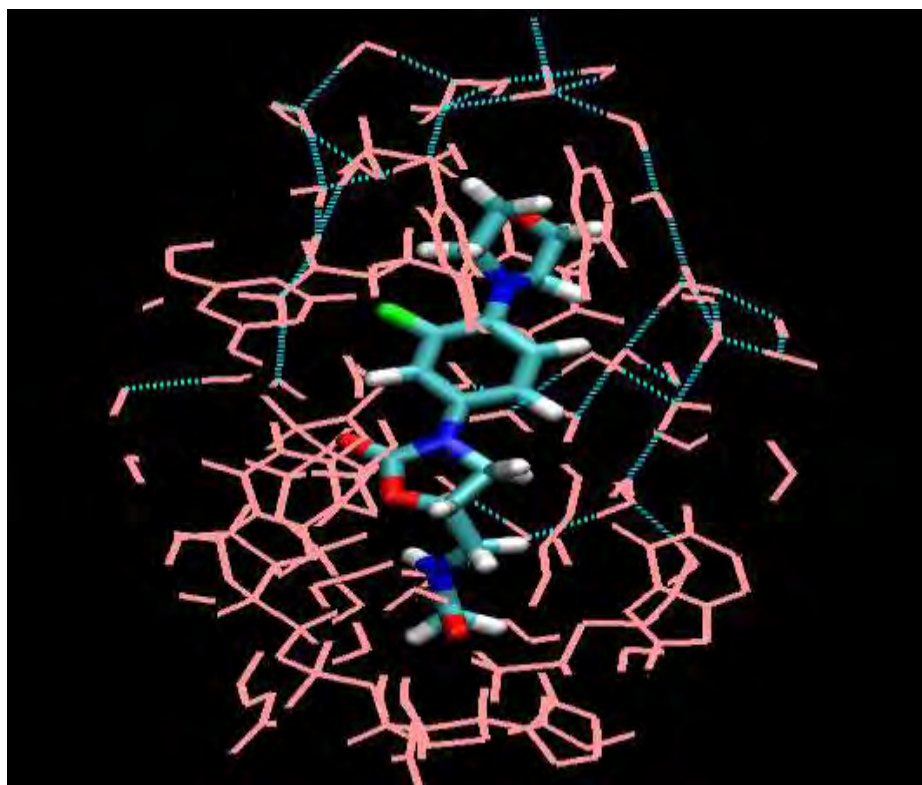


Εικόνα 31: Η λινεζολίδη απεικονίζεται με ροζ χρώμα, το RNA, που βρίσκεται σε απόσταση 6 Å από το αντιβιοτικό, με κίτρινο χρώμα και με μπλε χρώμα τα μόρια του νερού.

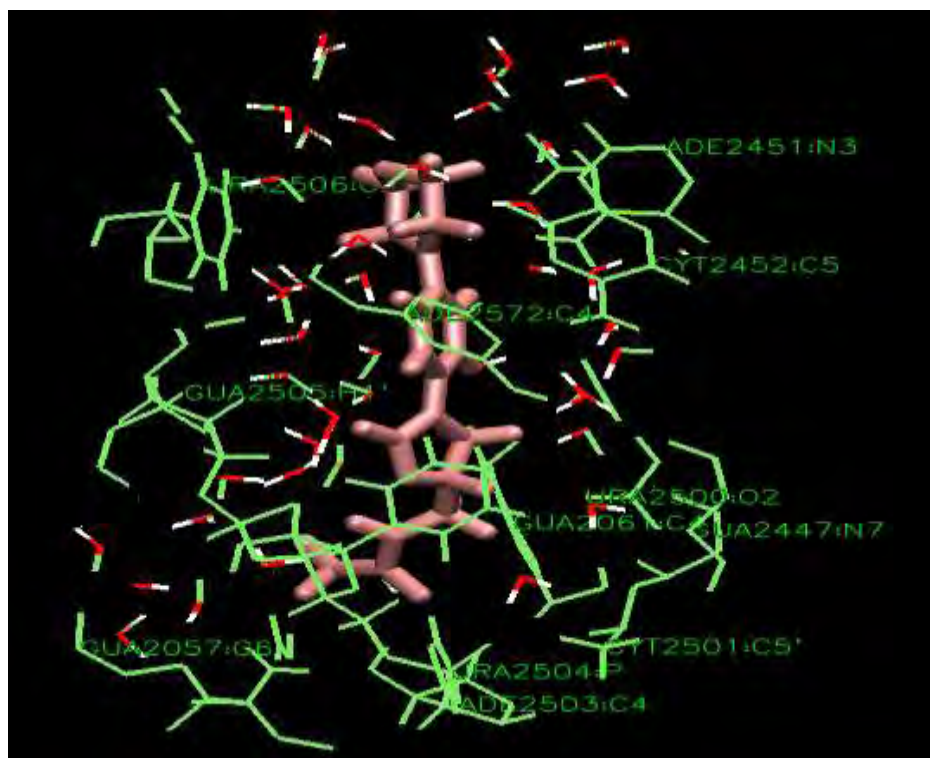
Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν, με τη βοήθεια του προγράμματος VMD [69], οι ενέργειες μεταξύ της λινεζολίδης και της 50S υπομονάδας.

Ενέργειες [kcal/mol]		
Elec	VdW	Nonbond
-81.2802	-48.1387	-129.419

Η εικόνα που ακολουθεί απεικονίζει τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται γύρω από τη λινεζολίδη, χωρίς να συμμετέχει η ίδια στο σχηματισμό τους. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ των μορίων νερού.



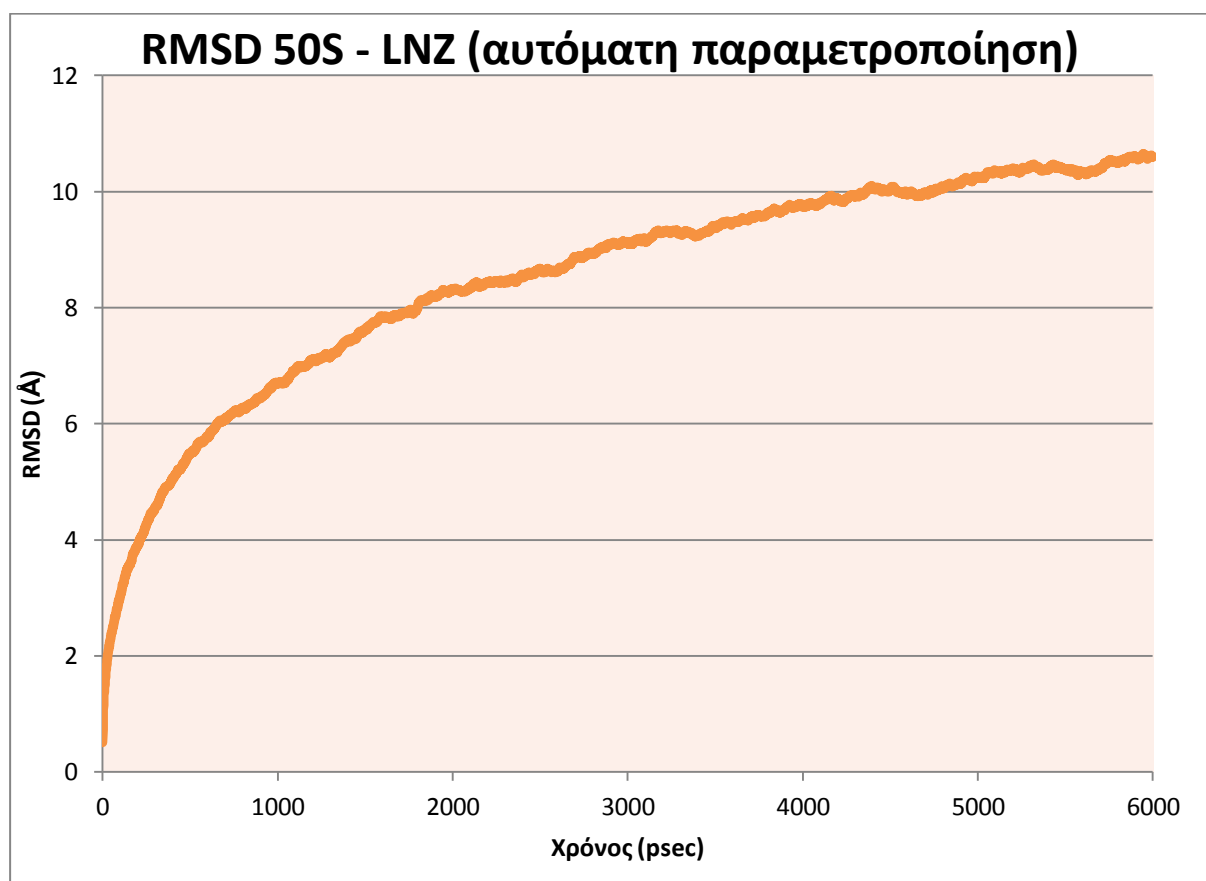
Εικόνα 32: Το RNA σε απόσταση 6 Å από το LNZ απεικονίζεται με ροζ χρώμα, ενώ με μπλε διάστικτες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων νερού.



Εικόνα 33: Απεικονίζονται τα νουκλεοτίδια της άμεσης γειτονιάς της λινεζολίδης.

14. Αποτελέσματα αυτόματης παραμετροποίησης (με το Swissparam)

Η εξισορρόπηση του συστήματος με τις παραμέτρους που προέκυψαν από το Swissparam διήρκεσε επίσης 6 ns και ακολούθησε μια ελαχιστοποίηση της εξισορροπημένης δομής 1000 βημάτων.



Διάγραμμα 2: Το RMSD του συστήματος 50S-λινεζολίδης μετά την αυτόματη παραμετροποίηση.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 3000 psec το RMSD συνεχώς αυξάνεται. Στα επόμενα 3000 psec, η μεταβολή του RMSD είναι πολύ μικρότερη και φαίνεται ότι αρχίζει να σταθεροποιείται.

Η δομή που προέκυψε μετά από τις προσομοιώσεις απεικονίζεται στην εικόνα 42.

Τα κατάλοιπα του 23S rRNA με τα οποία αλληλεπιδρά η λινεζολίδα είναι τα εξής:

- | | |
|------------|------------|
| ✓ GUA2061, | ✓ ADE2503, |
| ✓ URA2506, | ✓ URA2584, |
| ✓ GUA2505, | ✓ CYT2452, |
| ✓ CYT2501, | ✓ ADE2451, |

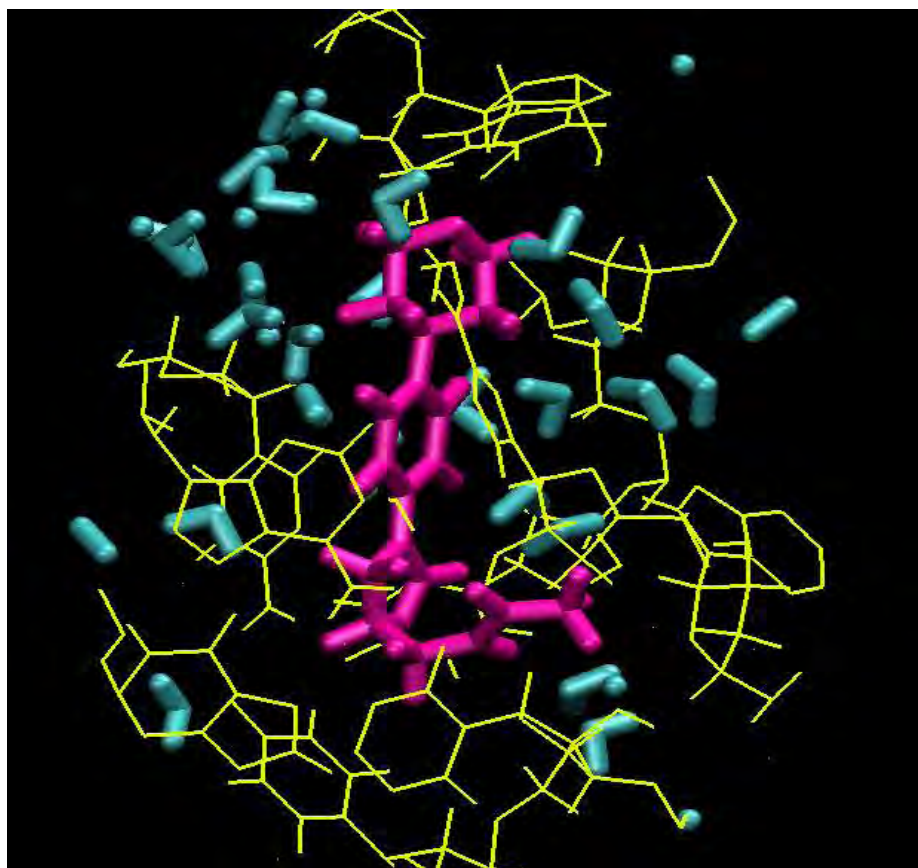
- ✓ URA2500,
- ✓ URA2504 και

- ✓ GUA2447.

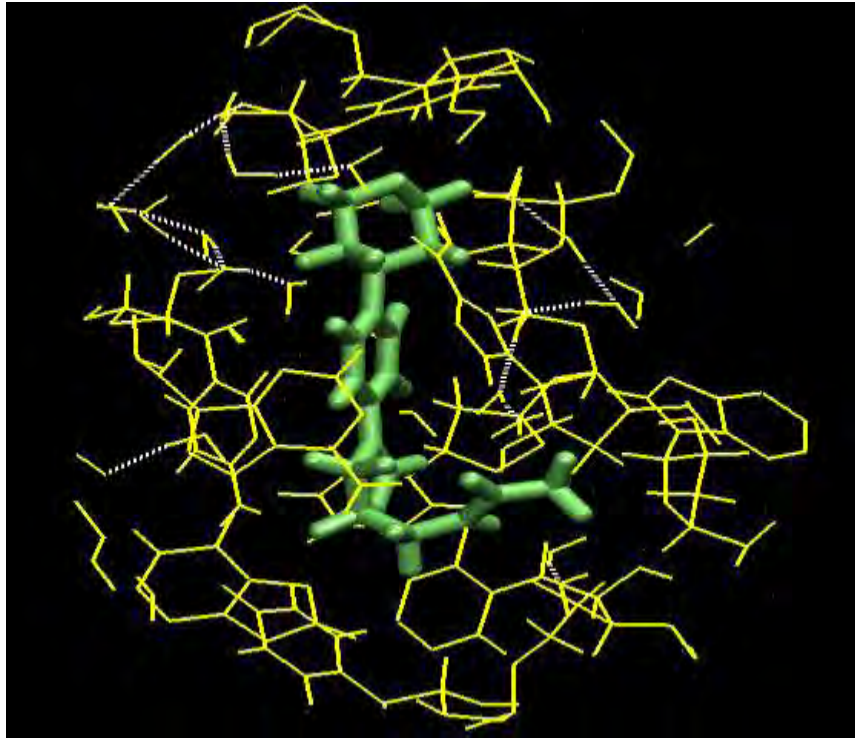
Πιο αναλυτικά, η ακεταμιδική ουρά της λινεζολίδης γειτνεύει με τα νουκλεοτίδια CYT2501, GUA2447, ADE2503 και GUA2061, ενώ ο πρώτος δακτύλιος με τα νουκλεοτίδια URA2504, CYT2452, ADE2451 και GUA2061. Όσον αφορά τον δεύτερο δακτύλιο, η άμεση γειτονιά του περιλαμβάνει άτομα των νουκλεοτιδίων GUA2061, GUA2505, CYT2452 και ADE2451, ενώ ο τρίτος δακτύλιος γειτνεύει με άτομα των νουκλεοτιδίων GUA2405, URA2506 και GUA2061.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι ενέργειες μεταξύ της λινεζολίδης και της 50S υπομονάδας.

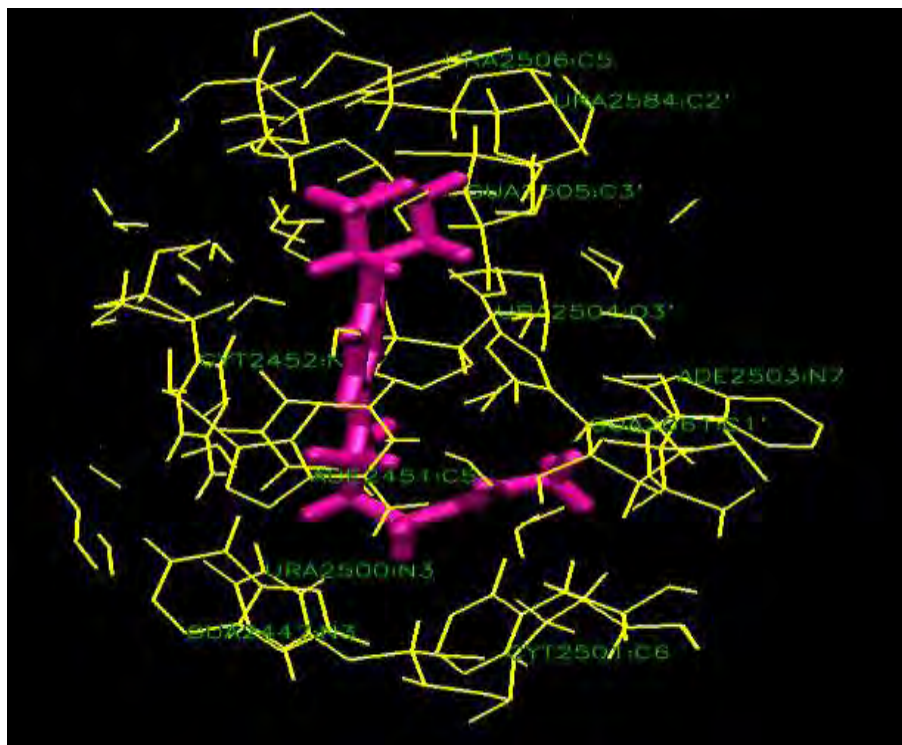
Ενέργειες [kcal/mol]		
Elec	VdW	Nonbond
-57.9489	-56.0486	-113.998



Εικόνα 34: Η λινεζολίδη απεικονίζεται με ροζ χρώμα, το RNA που βρίσκεται σε απόσταση 6 Å από το αντιβιοτικό με κίτρινο χρώμα και με μπλε χρώμα τα μόρια του νερού.



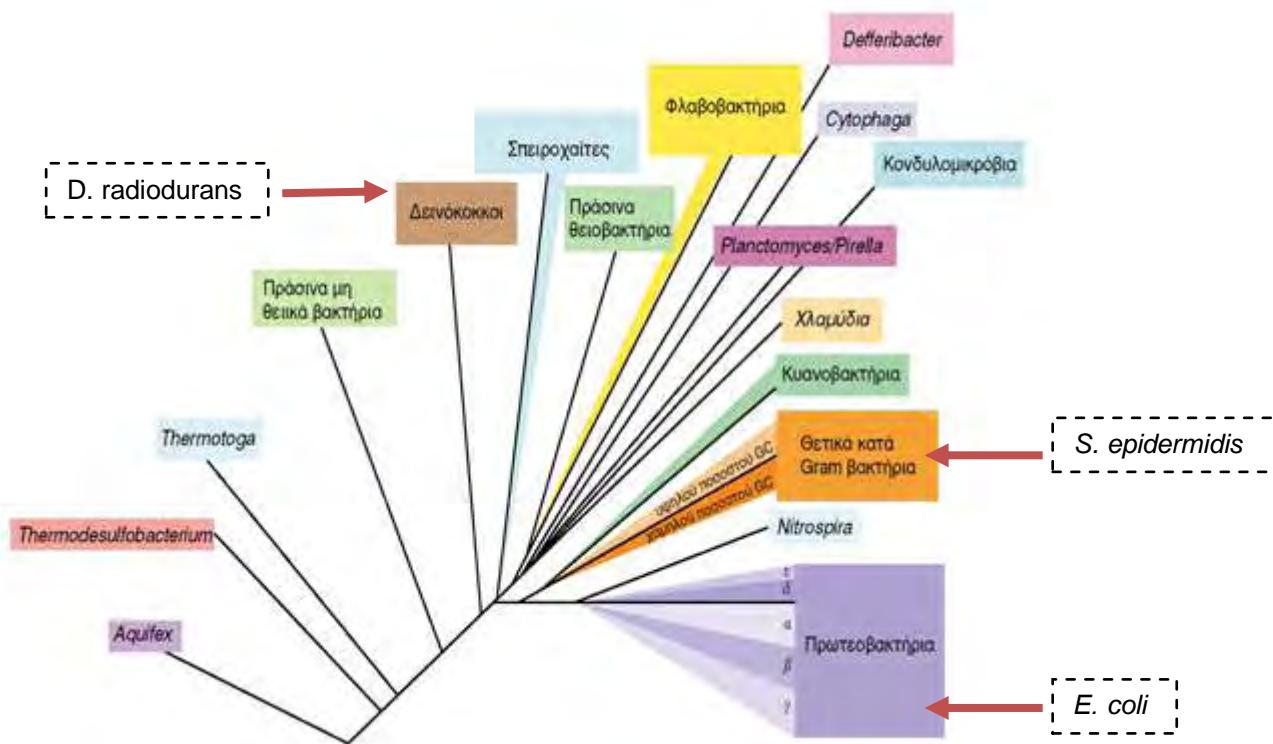
Εικόνα 35: Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με άσπρες διάστικτες γραμμές γύρω από τη λινεζολίδη (πράσινο) και το RNA (κίτρινο) σε απόσταση 6 Å.



Εικόνα 36: Απεικονίζονται τα νουκλεοτίδια του 23S rRNA της άμεσης γειτονιάς της λινεζολίδης.

15. Συζήτηση

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας παραμετροποιήθηκε το αντιβιοτικό λινεζολίδη για το CHARMM27 FF, προκειμένου να καταστεί δυνατή η πραγματοποίηση προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής αυτού σε σύμπλοκο με την 50S ριβοσωμική υπομονάδα του *E. coli*, με στόχο να κατανοηθεί ο μηχανισμός δράσης. Επειδή δεν έχει προσδιοριστεί πειραματικά η αντίστοιχη υπομονάδα κανενός είδους σταφυλόκοκκου, χρησιμοποιήθηκε μόνο η 50S υπομονάδα του *E. coli*. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέχρι τώρα κρυσταλλογραφικές μελέτες για τη λινεζολίδη έγιναν με το αρχαίο *H. marismortui* [6] και το βακτήριο *D. radiodurans* [7]. Το μεν αρχαίο δεν ανήκει καν στο ίδιο βασίλειο με το σταφυλόκοκκο, ενώ ο δεινόκοκκος είναι πολύ πιο μακριά εξελικτικά σε σύγκριση με το *E. coli*.

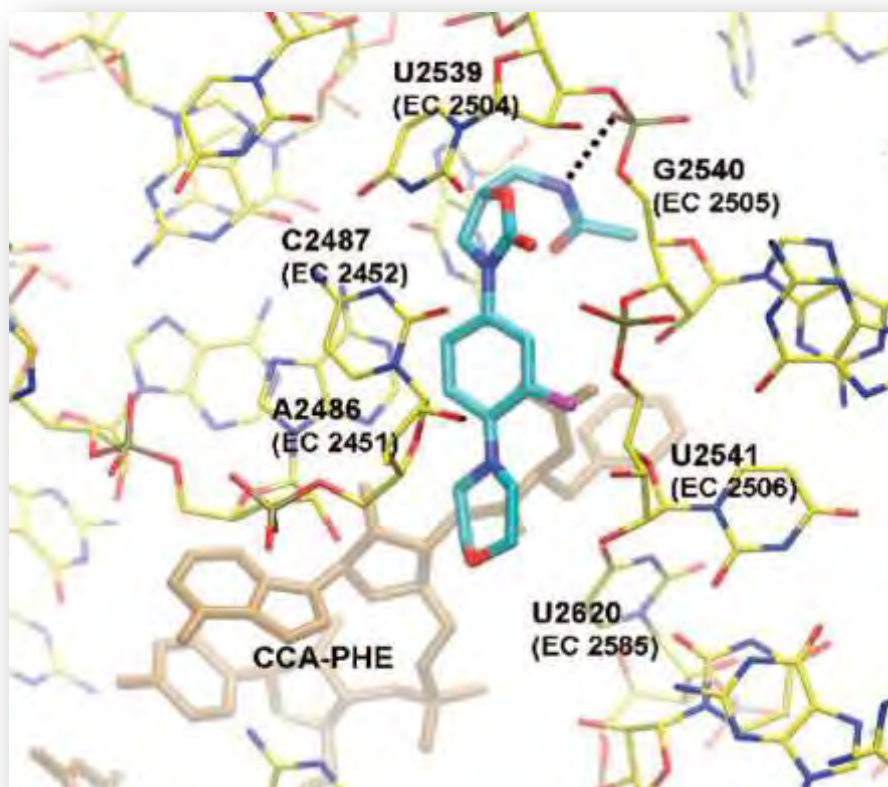


Εικόνα 37: Λεπτομερές φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων γενεαλογικών γραμμών (φυλών) των βακτηρίων, βασισμένο σε συγκρίσεις των αλληλουχιών του ριβοσωματικού RNA 16S [68].

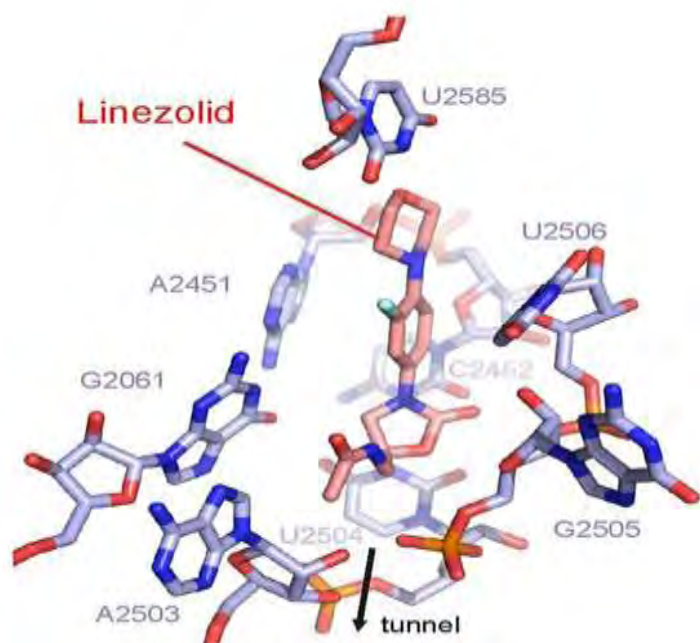
Όσον αφορά τους δεσμούς που σχηματίζονται γύρω από τη λινεζολίδη με τη συμμετοχή της ίδιας σε αυτούς, πρόκειται για ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δυνάμεις van der Waals που σχηματίζονται μεταξύ του αντιβιοτικού και του rRNA.

Εκτός από τις παραπάνω δυνάμεις, δημιουργείται γύρω από τη λινεζολίδη μια κανονική δομή, το λεγόμενο «έγκλειστο», από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων νερού και μεταξύ μορίων νερού και πολικών ομάδων.

Όσον αφορά στα περισσότερα νουκλεοτίδια με τα οποία γειτονεύει η λινεζολίδη, πρόκειται για συντηρημένα κατάλοιπα του PTC. Αν συγκριθούν τα νουκλεοτίδια του rRNA σε απόσταση 6 Å από τη λινεζολίδη στα δύο θεωρητικά μοντέλα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία, σε σύγκριση με τα νουκλεοτίδια της άμεσης επίσης γειτονιάς στους οργανισμούς *H. marismortui* και το βακτήριο *D. radiodurans*, που έχουν προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά, τα περισσότερα είναι κοινά με αυτά στο *D. radiodurans*. Αυτό είναι αναμενόμενο γιατί πρόκειται για βακτήριο, που σίγουρα θα έχει πιο πολλά κοινά στοιχεία με ένα άλλο βακτήριο, παρά με ένα αρχαίο που ανήκει σε άλλο βασίλειο.

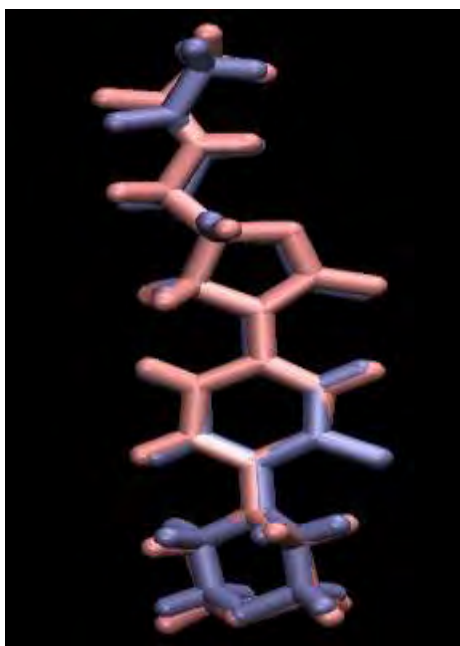


Εικόνα 38: Απεικονίζονται τα κατάλοιπα με τα οποία η λινεζολίδη σχηματίζει δυνάμεις van der Waals, καθώς και ο δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ της G2540 και της ακεταμιδικής ουράς στο *H. marismortui* [6].



Εικόνα 39: Απεικόνιση της λινεζολίδης (ροζ) μέσα στο θύλακα του *D. radiodurans*, ο οποίος σχηματίζεται από οχτώ καθολικά συντηρημένα νουκλεοτίδια (μπλε) του 23S rRNA. Το βέλος υποδεικνύει την κατεύθυνση της σήραγγας [7].

Οι παράμετροι που προέκυψαν μη αυτόματα αποδίδουν πολύ καλά την ελεύθερη κρυσταλλική μορφή (RMSD=0.69), ενώ η δομή στο ριβόσωμα δεν ταυτίζεται με τις κρυσταλλικές δομές της λινεζολίδης που προσδιορίστηκαν στους δύο οργανισμούς, *H. marismortui* και *D. radiodurans*. Η μόνη διαφορά που υπάρχει μεταξύ των δομών είναι ότι η δομή που προέκυψε από το θεωρητικό μοντέλο εμφανίζει μικρότερη κύρτωση στο ύψος της ακεταμιδικής ουράς. Τα επίπεδα των άλλων δακτυλίων ταυτίζονται και με τις δύο πειραματικές δομές. Ίσως οι παράμετροι των ατόμων που θα έπρεπε να σχηματίζουν πιο έντονη κύρτωση να μην είναι αρκετά ώριμες. Από την άλλη πλευρά, ο χρόνος της εξισορρόπησης θα μπορούσε να παραταθεί κι άλλο, προκειμένου να παγιωθεί η σταθερότητα που φαίνεται ότι αρχίζει να συμβαίνει στα 6 ns και ίσως η δομή μέσα σε αυτό το διάστημα να προσέγγιζε κι άλλο τις πειραματικές δομές. Ο χρόνος προσομοίωσης, λόγω της περιορισμένης υπολογιστικής ισχύος, ήταν ο ελάχιστος δυνατός χρόνος που εγγυάται ταυτόχρονα σχετικά αξιόπιστα αποτελέσματα.

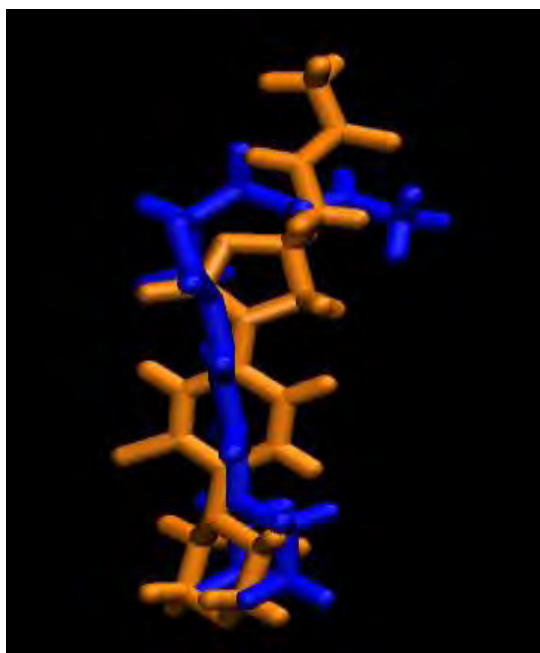


Εικόνα 40: Με ροζ απεικονίζεται η ελεύθερη μορφή της λινεζολίδης, όπως προέκυψε από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση και με μπλε η ελεύθερη κρυσταλλική μορφή.

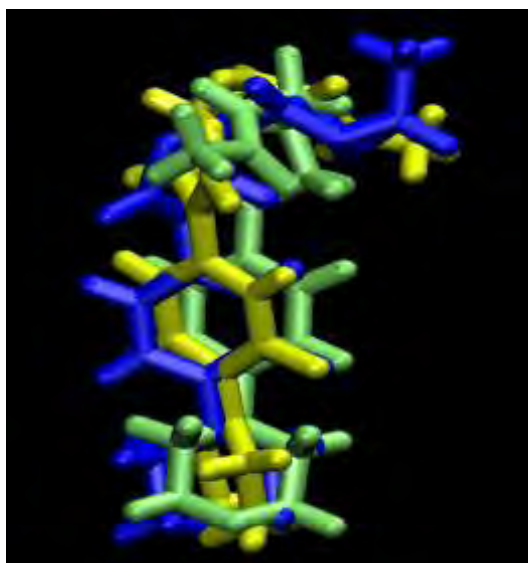


Εικόνα 41: Με πράσινο απεικονίζεται η δομή της λινεζολίδης μέσα στο ριβόσωμα του *E. coli* όπως προέκυψε από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση, με ροζ η δομή μέσα στο *D. radiodurans* και με πορτοκαλί η κρυσταλλική δομή της λινεζολίδης στο *H. marismortui*.

Όσον αφορά τις παραμέτρους της λινεζολίδης που προέκυψαν αυτόματα από το Swissparam [64], δεν αποδίδουν την ελεύθερη μορφή τόσο καλά, όταν η λινεζολίδα εξισορροπείται μόνη της διαλυμένη μέσα σε μία σφαίρα νερού. Αντιθέτως, όταν εξισορροπείται μαζί με τη ριβοσωμική υπομονάδα πλησιάζει περισσότερο τις πειραματικά προσδιορισμένες δομές σε σύγκριση με τις προηγούμενες παραμέτρους.



Εικόνα 42: Η ελεύθερη δομή της λινεζολίδης στο *E. coli*, όπως προέκυψε από την αυτόματη παραμετροποίηση. Χαρακτηριστική είναι η κύρτωση την οποία παρουσιάζει, σε αντίθεση με την ελεύθερη κρυσταλλική μορφή.



Εικόνα 43: Με μπλε απεικονίζεται η δομή της λινεζολίδης στο *D. radiodurans*, με κίτρινο η δομή στο *H. marismortui* και με πράσινο η δομή της λινεζολίδης στο *E. coli*, όπως προέκυψε από την αυτόματη παραμετροποίηση.

Και τα δύο θεωρητικά μοντέλα που προέκυψαν δείχνουν ότι η λινεζολίδα αλληλεπιδρά με το κέντρο της πεπτιδυλομεταφοράς του 23S rRNA επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες μελέτες.

Στο μέλλον, θα μπορούσε να διερευνηθεί, πώς αλληλεπιδρά η λινεζολίδα όταν το 23S rRNA έχει υποστεί κάποιες μεταλλάξεις, προκειμένου να κατανοηθεί αν

ευθύνονται οι μεταλλάξεις αυτές για την ανθεκτικότητα στη λινεζολίδη. Για το *E. coli* θα μπορούσαν να ελεγχθούν οι μεταλλάξεις G2447U και μεταλλάξεις στη θέση 2032, για τις οποίες υπάρχουν πειραματικά δεδομένα. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις στη θέση 2032, έχει βρεθεί ότι η ανθεκτικότητα στη λινεζολίδη αυξάνεται όταν η G2032 (αγρίου τύπου) \rightarrow U2032 \rightarrow C2032 \rightarrow A2032 [10]. Για το *S. epidermidis* ειδικά θα μπορούσαν να ελεγχθούν οι μεταλλάξεις: T2504A, G2576T, T2500A και C2534T [8,9].

Κρίνεται σκόπιμο να διερευνηθούν με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής οι μεταλλάξεις, γιατί μπορεί να μην παρατηρηθούν αλλαγές στον τρόπο σύνδεσης της λινεζολίδης και η ανθεκτικότητα να οφείλεται σε άλλες αιτίες που έχουν αναφερθεί, όπως: μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες L3, L4 και ίσως και στην L22 [41], καθώς και η ύπαρξη του γονιδίου *cfr* που κωδικοποιεί μια μεθυλοτρανσφεράση που μεθυλιώνει το νουκλεοτίδιο A2503 [8,9]. Επιπλέον, ενοχοποιούνται μεταλλάξεις σε μια ενδογενή ριβοσωμική μεθυλοτρανσφεράση που τροποποιεί το νουκλεοτίδιο G2445, καθώς και η τροποποιημένη εκροή του αντιβιοτικού μέσω θετικής ρύθμισης μεταφορέων ABC [42].

Το δομικό μοντέλο του κέντρου πεπτιδυλομεταφοράς σε σύμπλεγμα με τη λινεζολίδη θα μπορούσε επίσης να βοηθήσει στο σχεδιασμό νέων αντιβιοτικών, μιας τροποποιημένης λινεζολίδης αποτελεσματικής και για τα ανθεκτικά στη σημερινή μορφή της βακτήρια, αλλά και στον προσδιορισμό νέων θέσεων-στόχων στα βακτηριακά ριβοσώματα. Η πρωτεϊνοσύνθεση και λόγω της σημασίας που κατέχει για την επιβίωση κάθε οργανισμού, αλλά και λόγω της πολυπλοκότητας, λόγω της οποίας αυξάνονται τα σημεία όπου μπορεί κανείς να επέμβει, ενδείκνυται να είναι ο στόχος νέων φαρμάκων. Είναι γεγονός ότι τα βακτηριακά ριβοσώματα είναι ο στόχος περίπου των μισών από όλα τα αντιβιοτικά που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα.

Βιβλιογραφία

1. Schlünzen, F, Zarivach, R, Harms, J, Bashan, A, Tocilj, A, Albrecht, R, Yonath, A 2001, 'Structural basis for the interaction of antibiotic with the peptidyl transferase centre in eubacteria', *Nature*, vol. 413, pp. 814-821.
2. Franceschi, F & Duffy, EM 2006, 'Structure-based drug design meets the ribosome', *Biochemical Pharmacology*, vol. 71, pp. 1016-1025.
3. Walsh, C 2003, 'Where will come new antibiotics from?', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 1, pp.65-70.
4. Chang, YM, Jeng, WY, Ko, TP, Yeh, YJ, Chen, CKM & Wang, AHJ 2010, 'Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis*', *PNAS*, vol. 107, no. 19, pp. 8617-8622.
5. Gill, SR, Fouts, DE, Archer, GL, Mongodin, EF, Deboy, RT, Ravel, G, Paulsen, IT, Kolonay, JF, Brinkac, L, Beanan, M, et al. 2005, 'Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain', *J. Bacteriology*, vol. 187, pp. 2426-2438.
6. Ippolito, JA, Kanyo, ZF, Wang, D, Francheschi, FJ, Moore, PB, Steitz, TA & Duffy, EM 2008, 'Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit', *J. Med. Chem.*, vol. 51, pp. 3353-3356.
7. Wilson, DN, Schlunzen F, Harms, JM, Starosta, AL, Connell, SR & Fucini, P 2008, 'The oxazolidinone antibiotics perturb the ribosomal peptidyl-transferase center and effect tRNA positioning', *PNAS*, vol. 105, no.36, pp. 13339-13344.
8. Liakopoulos, A, Spiliopoulou, I, Damani, A, Kanellopoulou, M, Schoina, S, Papafragas, E, Marangos, M, Fligou, F, Zakyntinos, E, Makris, D, Protonotariou, E, Tsiapara, F, Filos, K, Diza, E, Anastassiou, ED & Petinaki, E 2010, 'Dissemination of two international linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones in Greek hospitals', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pp.1-2.
9. Liakopoulos, A, Neocleous, C, Klapsa, D, Kanellopoulou, M, Spiliopoulou, I, Mathiopoulos, KD, Papafrangas, E & Petinaki, E 2009, 'A T2504A mutation in the 23S rRNAa gene responsible for high-level resistance to linezolid of *Staphylococcus epidermidis*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64, pp. 206-211.

10. Xiong, L, Kloss, P, Douthwaite, S, Andersen, NM, Swaney, S, Shinabarger, DL & Mankin, AS 2000, 'Oxazolidinone resistance mutations in 23S rRNA of *Escherichia coli* reveal the central region of domain V as the primary site of drug action', *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 19, pp. 5325-5331.
11. Berg, JM, Tymoczko, JL & Stryer, L 2005, *Βιοχημεία*, 5th edn, Τόμος II, trans. Αλετράς, Α, Βαλκανά, Θ, Δραΐνας, Δ, Δραΐνας, Κ, Κούβελας, Η, Παπαδόπουλος, ΓΚ, Φράγκου-Λαζαρίδη, Μ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
12. Simonović, M & Steitz, TA 2009, 'A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation', *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1789, pp. 612-623.
13. Agmon, I, Amit, M, Auerbach, T, Bashan, A, Baram, D, Bartels, H, Berisio, R, Greenberg, I, Harms, J, Hansen, H, Kessler, M, Pyetan, E, Schlutzen, F, Sittner, A, Yonath, A & Zarivach, R 2004, 'Ribosomal crystallography: a flexible nucleotide anchoring tRNA translocation, facilitates peptide-bond formation, chirality discrimination and antibiotics synergism', *FEBS Lett.*, vol. 567, pp. 20-26.
14. Toh, SM & Mankin, AS 2008, 'An indigenous posttranscriptional modification in the ribosomal peptidyl transferase center confers resistance to an array of protein synthesis inhibitors', *J. Mol. Biol.*, vol. 380, pp. 593-597.
15. Lewin, B 2004, *Genes VIII*, Τόμος I, trans. Σταματογιαννόπουλος, Γ, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., Αλεξανδρούπολη.
16. Madigan, MT, Martinko, JM & Parker, J 2005, *Brock Βιολογία των μικροοργανισμών*, 10th edn, Τόμος II, trans. Γεωργακόπουλος, Δ, Διαλλινάς, Γ, Ζαχαριουδάκης, Γ, Καραγκούνη-Κύρτσου, Α, Κοκκορόγιαννης, Θ, Φριλίγγος, Σ, Χατζηλουκάς, Σ, Χριστιάς, Χ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
17. Page, Curtis, Sutter, Walker & Hoffman 2000, *Φαρμακολογία*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα.
18. Golan, DE, AH 2005, *Principles of pharmacology, The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, Lippincott Williams & Wilkins.
19. Leach, KL, Swaney, SM, Colca, JR, McDonald, WG, Blinn, JR, Thomasco, LM, Gadwood, RC, Shinabarger, D, Xiong, L & Mankin, AS 2007, 'The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria', *Cell*, vol. 26, pp. 393-402.

20. Yonath, A 2005, 'Antibiotics targeting ribosomes: Resistance, Selectivity, Synergism, and Cellular Regulation', *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, pp.649-79.
21. Sohmen, D, Harms, JM, Schlünzen, F & Wilson, DN 2009, 'Snapshot: Antibiotic inhibition of protein synthesis II', *Cell*, vol. 139.
22. Bozdogan, B & Appelbaum, PC 2004, 'Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance', *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 23, pp. 113-119.
23. Brickner, SJ 2007, 'Oxazolidinone Antibiotics', *Elsevier*, pp. 674-692.
24. Lin, AH, Murray, RW, Vidmar, TJ & Marotti, KR 1997, 'The oxazolidinone eperzolid binds to the 50S ribosomal subunit and competes with binding of chloramphenicol and lincomycin', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 41, pp. 2127-2131.
25. Aoki, H, Ke, L, Poppe, SM, Poel, TJ, Weaver, EA, Gadwood, RC et al. 2002, 'Oxazolidinone antibiotics target the P site on *Escherichia coli* ribosomes', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 46, pp. 1080-1085.
26. Brickner, SJ, Hutchinson, DK, Barachyn, MR, Manninen, PR, Ulanowich, DA, Garmon, SA et al 1996, 'Synthesis and antibacterial activity of U-100592 and U-100766, two oxazolidinone antibacterial agents for the potential treatment of multidrug-resistant gram-positive bacterial infections', *J Med Chem*, vol. 39, pp. 673-679.
27. Zurenko, GE, Yagi, BH, Schaadt, RD, Allison, JW, Kilburn, JO, Glickman, SE et al. 1996, 'In vitro activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antibacterial agents', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 40, pp. 839-845.
28. Corti, G, Cinelli, R & Paradisi, F 2000, 'Clinical and microbiologic efficacy and safety profile of linezolid, a new oxazolidinone antibiotic', *Int J Antimicrob Agents*, vol. 16, pp. 527-530.
29. Shinabarger, DL, Marotti, KR, Murray, RW, Lin, AH, Melchior, EP, Swaney, SM, Duniak, DS, Demyan WF & Buysse, JM 1997, 'Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperzolid on translation reactions', *Antimicrob. Agents Chemother.* vol.41, pp. 2132-2136.
30. Swaney, SM, Aoki, H, Ganoza, MC & Shinabarger, DL 1998, 'The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 42, pp. 3251-3255.

31. Matassova, NB, Rodnina, NB, Endermann, R, Kroll, HP, Pleiss, U, Wild, H & Wintermeyer, W 1999, 'Ribosomal RNA is the target of oxazolidinones, a novel class of translational inhibitors', *RNA*, vol. 5, pp. 939-946.
32. Eustice, DC, Feldman, PA, Zajac, I & Slee, AM 1988, 'Mechanism of action DuP 721: inhibition of an early event during initiation of protein synthesis', *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 32, pp. 1218-1222.
33. Kloss, PL, Xiong, DL, Shinabarger, DL & Mankin, AS 1999, 'Resistance mutations in 23S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center', *J. Mol. Biol.*, vol. 294, pp. 93-101.
34. Tanaka, R & Hirayama, N 2008, 'Crystal structure of linezolid', *Analytical Sciences*, vol. 24, pp. x43-44.
35. Brickner, SJ 2007, 'Zyvox', *Elsevier*, pp. 157-171.
36. Stevens, DL, Dotter, B & Madaras-Kelly, K 2004, 'A review of linezolid: the first oxazolidinone antibiotic', *Expert Rev. Anti-infect. Ther.*, vol. 2, no. 1, pp. 51-59.
37. Meka, VG, Pillai, SK, Sakoulas, G, Wennersten, C, Venkataraman, L, DeGirolami, PC, Eliopoulos, GM, Moellering, RC & Gold, HS 2004, 'Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA', *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 190, pp. 311-317.
38. Miller, K, Dunsmore, CJ, Fishwick, CWG & Chopra, I 2008, 'Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center', *Antimicrob Agents and Chemother*, vol. 52, no. 5, pp. 1737-1742.
39. Velez, JCQ & Janech, MG 2010, 'A case of lactic acidosis induced by linezolid', *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 6, pp. 236-242.
40. Skripkin, E, McConell, TS, DeVito, J, Lawrence, L, Ippolito, A, Duffy, EM, Sutcliffe, J & Franceschi, F 2008, 'R_X-01, a new family of oxazolidinones that overcome ribosome-based linezolid resistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, no. 10, pp. 3550-3557
41. Locke, JB, Hilgers, M & Shaw, KJ 2009, 'Mutations in ribosomal protein L3 are associated with oxazolidinone resistance in *Staphylococci* of clinical origin', *Antimicrob Agents and Chemother*, vol. 53, no. 12, pp. 5275-5278.
42. Locke, JB, Hilgers, M & Shaw, KJ 2009, 'Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the

- oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700)', *Antimicrob Agents and Chemother*, vol. 53, no. 12, pp. 5265-5274.
43. Davidovich, D, Bashan, A & Yonath, A 2008, 'Structural basis for cross-resistance to ribosomal PTC antibiotics', *PNAS*, vol. 105, no. 52, pp. 20665-20670.
 44. Wilson, DN & Nierhaus, KH 2007, 'The oxazolidinone class of drugs find their orientation on the ribosome', *Cell*, vol. 26, pp. 460-462.
 45. Fung, HB, ??????? 2001, 'Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent', *Clinical Therapeutics*, vol. 23, no. 3, pp. 356-391.
 46. Sander
 47. Feng, JA, Lupien, H, Gingras, J, Wasserscheid, K, Dewar, D, Legare, D & Ouellette, M 2009, 'Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance', *Genome Res.*, vol. 19, pp. 1214-1223.
 48. Cundliffe, E 1989, 'How antibiotic-producing organisms avoid suicide', *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 43, pp. 207-233.
 49. Liu, M & Douthwaite, S 2002, 'Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy', *PNAS*, vol. 99, pp. 14658-14663.
 50. Gutgsell, NS, Deutscher, MP & Ofengand, J 2005, 'The pseudouridine synthase RluD is required for normal ribosome assembly and function in *Escherichia coli*', *RNA*, vol.11, pp. 1141-1152.
 51. Liang, XH, Liu, Q & Fournier MJ 2007, 'rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity', *Mol. Cell*, vol. 28, pp. 965-977.
 52. Decatur, WA, Liang, XH, Pienka-Przybylska, D & Fournier, MJ 2007, 'Identifying effects of sno-RNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome', *Methods Enzymol.*, vol. 425, pp. 283-316.
 53. Chow, CS, Lamichhane, TN & Mahto, SK 2007, 'Expanding the nucleotide repertoire of the ribosome with post-transcriptional modifications', *ACS Chem. Biol.*, vol. 2, pp. 610-619.
 54. Xu, Z, O'Farrell, HC, Rife, JP & Culver, GM 2008, 'A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis', *Nat. Struct. Mol. Biol*, vol. 15, pp. 534-536.
 55. Καραγκούνη-Κύρτσου, Α 1999, *Μικροβιολογία*, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

56. Otto, M 2009, '*Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, pp. 555-567.
57. Raskin, DM, Seshadri, R, Pukatzki, SU & Mekalanos, JJ 2006, 'Bacterial genomics and pathogen evolution', *Cell*, vol. 124, pp. 703-714.
58. Becker, OM, MacKerell, AD, Roux, B & Watanabe, M 2001, *Computational Biochemistry and Biophysics*, Marcel Dekker, New York.
59. Brooks III, CL, Karplus, M, Pettitt, BM 1988, *Proteins, a theoretical perspective: dynamics, structure, and thermodynamics*, vol. 71, Wiley, New York.
60. McCammon, JA & Harvey, SC 1987, *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge Univ Press, New York.
61. Burkert, U & Allinger, NL 1982, *Molecular mechanics*, American Chemical Society, Washington, DC.
62. Oakley, A, Isgro, T & Wang, Y 2006, *Topology file tutorial*, University of Illinois, viewed 6 February 2011, <<http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/science/topology/topology-html/>>.
63. Amaro, R, Dhaliwal, B & Luthey-Schulten, Z 2007, *Parameterizing a novel residue (Linux version)*, University of Illinois, viewed 6 February 2011, <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/science/forcefield-tutorial/linux/forcefield-linux.pdf>.
64. V. Zoete, MA. Cuendet, A. Grosdidier, O. Michielin, *SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules*, <<http://www.swissparam.ch>>.
65. Brooks BR, Brooks, CL, Mackerell, AD, Nilsson, L, Petrella, RJ, Roux, B, Won, Y, Archontis, G, Bartels, C, Boresch S, Caflisch, A, Caves, L, Cui, Q, Dinner, AR, Feig, M, Fischer, S, Gao, J, Hodoscek, M, Im, W, Kuczera, K, T. Lazaridis, K, Ma, J, Ovchinnikov, V, Paci, E, Pastor, RW, Post, CB, Pu, JZ, Schaefer, M, Tidor, B, Venable, RM, Woodcock, HL, Wu, X, Yang, W, York, DM, & Karplus, M 2009, CHARMM: The Biomolecular simulation Program, *J. Comp. Chem.*, vol. 30, pp. 1545-1615.
66. Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997), SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723, computer program, viewed 5 April 2010, <<http://www.expasy.org/spdbv/>>.
67. The Cambridge Structural Database, viewed 5 September 2010, <<http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>>.

68. Madigan, MT, Martinko, JM & Parker, J 2005, *Brock Βιολογία των μικροοργανισμών*, 10th edn, Τόμος Ι, trans. Γεωργακόπουλος, Δ, Διαλλινάς, Γ, Ζαχαριουδάκης, Γ, Καραγκούνη-Κύρτσου, Α, Κοκκορόγιαννης, Θ, Φριλίγγος, Σ, Χατζηλουκάς, Σ, Χριστιάς, Χ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
69. Humphrey, W, Dalke, A & Schulten, K 1996, VMD: visual molecular dynamics, ver. 1.8.7, computer program, *J Mol Graph.* 14, 33-8, 27-8.
70. *Molecular Conceptor*, computer program, Accelrys.
71. Kale, L, Skeel, R, Bhandarkar, M, Brunner, R, Gursoy, A, Krawetz, N, Phillips, J, Shinozaki, A, Varadarajan, K & Schulten, K 1999, NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics, *J Comput Phys.* 151, 283-312.

Παράρτημα

1. Ομοπαράθεσις

A) Σταφυλόκοκκου – *E. coli*

Readseq version 2.1.27 (19-Apr-2008) Readseq version 2.1.27 (19-Apr-2008)

lalign output for staphulococcus vs. e coli

[ISREC-Server] Date: Sun May 30 17:26:53 2010

```
ulimit -t 30; /usr/molbio/bin/lalign -f -14 -g -4 -K 3 ./wwtmp/.5315.1.seq
./wwtmp/.5315.2.seq > ./wwtmp/.5315.out LALIGN finds the best local
alignments between two sequences version 2.1u09 December 2006 Please cite:
X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 resetting to DNA
matrix alignments < E( 0.05):score: 89 (3 max)
```

Comparison of:

(A) ./wwtmp/.5315.1.seq staphulococcus 2921 bp
- 2921 nt

(B) ./wwtmp/.5315.2.seq e coli 2904 bp
- 2904 nt

using matrix file: DNA (5/-4), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05

71.6% identity in 2966 nt overlap (1-2919:3-2902); score: 6804 E(10000):
0

```
                2010          2020          2030          2040          2050          2060
staphu CGATTTGGGCA--CTGTCTCAACGAGAGACTCGGTTGAAATCATAGTACCTGTGAAGATGC
      ::  :::  ::  :::::  ::  :::::  :::::  :  :  :::::
e      TGA--TGGCCAGGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATTGAACTCGCTGTGAAGATGC
1980          1990          2000          2010          2020          2030
                2070          2080          2090          2100          2110          2120
staphu AGGTTACCCGCGACAGGACGGAAAGACCCCGTGGAGCTTTACTGTAGCCTGATATTGAAA
      ::  :::::  ::  :::::  :::::  :  :::::  ::::  :::  :  ::::
e      AGTGTACCCGCGCAAGACGGAAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAAC
2040          2050          2060          2070          2080          2090
```

```

                2130      2140      2150      2160      2170      2180
staphu TTCGGCACAGCTTGTACAGGATAGGTAGGAGCCTTTGAAACGTGAGCGCTAGCTTACGTG
      : :   :   :::  ::::::::::  ::::  ::::::::::  :::  :::  ::  : :  ::
e      ATTGAGCCTTGATGTGTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGTGTGGACGCCAGTCTGCATG
2100      2110      2120      2130      2140      2150

                2190      2200      2210      2220      2230      2240
staphu GAGGCGCTGGTGGGATACTACCCTAGCTGTGTTGGCTTTCTAACCCGCACCACTTATCGT
      :::  ::   ::  ::::  :::::  ::::  ::::  ::::  ::::  ::  :  :::
e      GAGCCGACCTTGAAATACCACCCTTTAATGTTTGATGTTCTAACGTTGACCCGTAATCCG
2160      2170      2180      2190      2200      2210

                2250      2260      2270      2280      2290      2300
staphu GGTGGGAGACAGTGTTCAGGCGGGCAGTTTGACTGGGGCGGTTCGCCTCCTAAAAGGTAACG
      :::  :  ::::::::::  ::  :::  ::::::::::::::::::::::  ::::::::::  :::::
e      GGTTCGCGACAGTGTCTGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCTAAAAGAGTAACG
2220      2230      2240      2250      2260      2270

                2310      2320      2330      2340      2350      2360
staphu GAGGCGCTCAAAGGTTCCCTCAGAATGGTTGAAATCATTCATAGAGTGTAAGGCATAA
      ::::  ::  :  :::::  ::  :  ::::  :::  ::::  ::::  ::  ::  :::::
e      GAGGAGCACGAAGGTTGGCTAATCCTGGTTCGGACATCAGGAGGTTAGTGCAATGGCATAA
2280      2290      2300      2310      2320      2330

                2370      2380      2390      2400      2410      2420
staphu GGGAGCTTGACTGCGAGACCTACAAGTCGAGCAGGGTCGAAAAGACGGACTTAGTGATCCG
      :  ::::::::::::::  ::  :::::  :::::  ::  :  ::::::::::
e      GCCAGCTTGACTGCGAGCGTGACGGCGGAGCAGGTGCGAAAAGCAGGTCATAGTGATCCG
2340      2350      2360      2370      2380      2390

```


alignments between two sequences version 2.1u09 December 2006 Please cite: X.

Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 resetting to DNA matrix

alignments < E(0.05):score: 89 (3 max)

Comparison of:

(A) ./wwtmp/.12540.1.seq staphylococcus 2921 bp

-

2921 nt

(B) ./wwtmp/.12540.2.seq deinococcus 2882 bp

-

2882 nt

using matrix file: DNA (5/-4), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05

72.7% identity in 2952 nt overlap (1-2920:4-2879); score: 6927
E(10000):

0

Γ) Σταφυλόκοκκου - *Haloarcula*

Readseq version 2.1.27 (19-Apr-2008) Readseq version 2.1.27 (19-Apr-2008)

lalign output for staphylococcus vs. Haloarcula

[ISREC-Server] Date: Sun May 30 17:33:37 2010

ulimit -t 30; /usr/molbio/bin/lalign -f -14 -g -4 -K 3

./wwtmp/.30526.1.seq ./wwtmp/.30526.2.seq > ./wwtmp/.30526.out

LALIGN finds the best local alignments between two sequences version 2.1u09 December 2006 Please cite: X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381 resetting to DNA matrix alignments < E(0.05):score: 89 (3 max)

Comparison of:

(A) ./wwtmp/.30526.1.seq staphylococcus 2921 bp

- 2921 nt

(B) ./wwtmp/.30526.2.seq haloarcula 2922 bp

- 2922 nt

using matrix file: DNA (5/-4), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05

58.2% identity in 3052 nt overlap (21-2918:19-2922); score: 2544
E(10000): 1.1e-202

2. Το αρχείο τοπολογίας της λινεζολίδης

2.1 από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση

```
MASS 100 NCC 14.00700 N !
MASS 124 F1 18.99800 F !
MASS 121 CF1 12.01100 C !
MASS 131 CE 12.01100 C !

RESI ZLD 0.00
GROUP
ATOM C12 CT3 -0.27 !-0.14 H11
ATOM H10 HA 0.09 ! 0.06 |
ATOM H11 HA 0.09 ! H12-C12-H10
ATOM H12 HA 0.09 ! |
GROUP ! O3=C11
ATOM C11 CE 0.51 ! 0.24 |
ATOM O3 O -0.51 ! H9-N2 -0.37
GROUP ! |
ATOM N2 NH1 -0.47 ! H7-C10-H8
ATOM H9 H 0.39 ! 0.08 |
ATOM C10 CT2 -0.10 !idio O2-C9-H4
ATOM H7 HA 0.09 !idio | \
ATOM H8 HA 0.09 ! O1=C7 C8-H5
!0.03 \ / \
GROUP ! N1 H6
ATOM C9 CT1 0.18
ATOM H4 HA 0.10 ! 0.09 |
ATOM O2 OS -0.34 !-0.24 C4
ATOM C7 CN1T 0.55 !0.36 // \
ATOM O1 ON1 -0.40 ! H1-C3 C5-H2
ATOM C8 CT2 0.21 !-0.12| ||
ATOM H5 HA 0.10 ! F1-C2 C6-H3
ATOM H6 HA 0.10 ! 0.08 \\ /
ATOM N1 NN2B -0.50 ! 0.02 C1
GROUP ! |
ATOM C4 CN5 0.28 ! H17 N3 H16
ATOM C3 CA -0.20 ! \ / \ /
ATOM H1 HP 0.12 ! H18-C14 C15-H15
ATOM C2 CN7 -0.06 ! 0.1 | |
ATOM F1 FN1 -0.22 ! H19-C13 C16-H13
! / \ / \
ATOM C1 CN5 0.28 ! H20 O4 H14
ATOM C6 CA -0.22
ATOM H3 HP 0.12
ATOM C5 CA -0.22
ATOM H2 HP 0.12
GROUP
ATOM N3 NN2B -0.61
ATOM C14 CT2 0.13
ATOM H17 HA 0.08
ATOM H18 HA 0.08
ATOM C13 CT2 0.13
ATOM H19 HA 0.08
```

ATOM H20 HA 0.08
 ATOM O4 OH1 -0.54
 ATOM C16 CT2 0.13
 ATOM H13 HA 0.08
 ATOM H14 HA 0.08
 ATOM C15 CT2 0.13
 ATOM H15 HA 0.08
 ATOM H16 HA 0.07

BOND C1 C6 C1 C2 C1 N3
 BOND C2 C3 C2 F1 C3 C4 C3 H1
 BOND C4 N1 C4 C5 C5 H2 C5 C6
 BOND C6 H3 N1 C8 N1 C7 C7 O2
 BOND C7 O1 O2 C9 C8 C9 C8 H5
 BOND C8 H6 C9 H4 C9 C10 C10 H7
 BOND C10 H8 C10 N2 C11 N2 C11 O3
 BOND C11 C12 N2 H9 C12 H11 C12 H12
 BOND C12 H10 C13 C14 C13 O4 C13 H19
 BOND C13 H20 C14 H17 C14 H18 C14 N3
 BOND N3 C15 C15 H15 C15 H16 C15 C16
 BOND C16 O4 C16 H13 C16 H14

IMPR C4 C3 C5 N1
 IMPR C3 H1 C2 C4
 IMPR C5 H2 C4 C6
 IMPR C6 H3 C1 C5
 IMPR C1 N3 C2 C6
 IMPR C2 F1 C1 C3
 IMPR C7 N1 O1 O2

IMPR C11 C12 N2 O3
 IMPR N1 C8 C4 C7
 IMPR C8 C9 N1 H6
 IMPR C8 C9 N1 H5
 IMPR C9 C10 C8 O2
 IMPR C9 C10 C8 H4
 IMPR C10 N2 C9 H8
 IMPR C10 N2 C9 H7
 IMPR N2 C11 C10 H9
 IMPR C12 H12 C11 H11
 IMPR C12 H12 C11 H10
 IMPR N3 C14 C1 C15
 IMPR C14 C13 N3 H17
 IMPR C14 C13 N3 H18
 IMPR C13 O4 C14 H20
 IMPR C13 O4 C14 H19
 IMPR C15 C16 N3 H16
 IMPR C15 H16 N3 H15
 IMPR C16 O4 C15 H14
 IMPR C16 H14 C15 H13

ANGLE C6 C1 C3 C2 C1 C6 C2 C1 N3 C1 C2 C3 C1 C2 F1 C3 C2 F1
 ANGLE C2 C3 C4 C2 C3 H1 C4 C3 H1 C3 C4 N1 C3 C4 C5 C5 C4 N1
 ANGLE C4 C5 H2 C4 C5 C6 C6 C5 H2 C1 C6 C5 C1 C6 H3 C5 C6 H3
 ANGLE C4 N1 C8 C4 N1 C7 C7 N1 C8 N1 C7 O2 N1 C7 O1 O1 C7 O2
 ANGLE C7 O2 C9 N1 C8 C9 N1 C8 H5 N1 C8 H6 C9 C8 H5 C9 C8 H6

ANGLE H5 C8 H6 O2 C9 C8 O2 C9 H4 O2 C9 C10 C8 C9 H4 C8 C9 C10
ANGLE C10 C9 H4 C9 C10 H7 C9 C10 H8 C9 C10 N2 H7 C10 H8 N2 C10
H7
ANGLE N2 C10 H8 N2 C11 O3 N2 C11 C12 O3 C11 C12 C10 N2 C11 C10
N2 H9
ANGLE C11 N2 H9 C11 C12 H11 C11 C12 H12 C11 C12 H10 H11 C12 H12
ANGLE H10 C12 H11 H10 C12 H12 C14 C13 O4 C14 C13 H19 C14 C13 H20
ANGLE O4 C13 H19 O4 C13 H20 H19 C13 H20 C13 C14 H17 C13 C14 H18
ANGLE C13 C14 N3 H18 C14 H17 N3 C14 H17 N3 C14 H18 C1 N3 C14
ANGLE C1 N3 C15 C14 N3 C15 N3 C15 H15 N3 C15 H16 N3 C15 C16 H15
C15 H16
ANGLE C16 C15 H15 C16 C15 H16 C15 C16 H13 C15 C16 H14 O4 C16 C13
ANGLE O4 C16 H14 H13 C16 H14 C13 O4 C16
IC C3 C2 C1 C6 1.355 124.447 -1.322 115.668 1.357
IC C2 C1 C6 C5 1.378 115.668 -0.211 122.652 1.388
IC C6 C1 N3 C14 1.357 124.786 -120.107 115.825 1.471
IC C1 C2 C3 C4 1.378 124.447 2.061 118.878 1.395
IC C2 C3 C4 N1 1.355 118.878 176.993 121.589 1.425
IC C3 C4 C5 H2 1.395 118.327 -179.527 120.772 1.033
IC C3 C4 N1 C8 1.395 121.589 -169.696 120.926 1.474
IC C1 C6 C5 C4 1.357 122.652 0.933 119.999 1.379
IC C4 N1 C7 O2 1.425 127.146 176.969 110.654 1.340
IC C4 N1 C8 C9 1.425 120.926 177.000 100.960 1.546
IC N1 C7 O2 C9 1.341 110.654 2.571 111.068 1.435
IC C7 O2 C9 C8 1.340 111.068 -9.971 104.341 1.546
IC N1 C8 C9 O2 1.474 100.960 12.589 104.341 1.435
IC O2 C9 C10 H7 1.435 109.508 173.052 108.943 0.938
IC C9 C10 N2 C11 1.486 113.085 -104.104 122.796 1.331
IC C10 N2 C11 O3 1.458 122.796 -0.477 122.204 1.235
IC N2 C11 C12 H11 1.331 116.685 -151.147 114.127 0.920
IC O4 C13 C14 H17 1.358 114.713 173.962 108.383 0.961
IC C14 C13 O4 C16 1.513 114.713 54.436 110.012 1.407
IC C1 N3 C14 C13 1.417 115.825 -174.852 111.040 1.513
IC C1 N3 C15 H16 1.417 116.258 48.425 114.038 0.933
IC N3 C15 C16 O4 1.470 110.885 56.099 114.394 1.407
IC C13 O4 C16 C15 1.358 110.012 -55.227 114.394 1.489
IC C14 N3 C15 C16 1.471 108.406 -53.241 110.885 1.489
IC H14 C16 O4 C13 0.969 111.558 -175.540 110.012 1.358
IC H18 C14 C13 H20 1.028 103.986 -176.696 105.121 0.964
IC H19 C13 O4 C16 0.949 108.056 -178.773 110.012 1.407
IC H19 C13 C14 H18 0.949 112.809 -58.756 103.986 1.028
IC H17 C14 C13 O4 0.961 109.383 173.962 114.713 1.358
IC H17 C14 N3 C1 0.961 117.578 -49.253 115.825 1.417
IC H18 C14 N3 C1 1.028 112.324 69.179 115.825 1.417
IC H14 C16 C15 H16 0.969 106.007 -59.920 110.723 0.933
IC H13 C16 C15 H15 0.944 104.352 176.911 105.561 0.994
IC C13 O4 C16 H14 1.358 110.012 -175.540 111.558 0.969
IC H15 C15 N3 C1 0.994 108.094 -70.520 116.258 1.417
IC C15 N3 C14 C13 1.470 108.406 52.378 111.040 1.513
IC N3 C1 C6 H3 1.417 124.786 4.536 117.355 0.964
IC H3 C6 C5 H2 0.964 119.904 -3.227 119.226 1.033
IC F1 C2 C3 H1 1.361 114.144 -5.945 121.979 1.002
IC C7 N1 C8 H6 1.341 111.218 -131.112 112.043 0.961

IC H6 C8 C9 H4 0.961 111.805 11.083 110.127 0.954
 IC H5 C8 C9 H4 0.956 112.277 132.699 110.127 0.954
 IC H4 C9 C10 H7 0.954 106.739 -65.072 108.943 0.938
 IC H7 C10 N2 C11 0.938 112.050 19.494 122.796 1.331
 IC H8 C10 N2 C11 0.981 109.748 139.165 122.796 1.331
 IC H9 N2 C10 C9 0.982 117.562 47.059 113.085 1.486
 IC H9 N2 C11 C12 0.982 113.714 29.499 116.685 1.494
 IC O3 C11 C12 H11 1.235 121.076 30.963 114.127 0.920
 IC O3 C11 C12 H10 1.235 121.076 151.659 109.774 1.004
 IC O3 C11 C12 H12 1.235 121.076 -94.455 110.969 0.970
 IC O1 C7 N1 C4 1.196 126.894 -3.031 127.146 1.425
 IC C7 N1 C8 C9 1.341 111.218 -12.0 100.960 1.546
 IC H1 C3 C4 N1 1.002 119.0 -0.5 121.6 1.425
 IC C7 N1 C8 C9 1.341 111.218 -11.994 100.960 1.546
 IC O2 C7 N1 C8 1.340 110.654 6.655 111.218 1.474
 IC C8 C9 O2 C7 1.546 104.341 -9.971 111.068 1.340
 IC O2 C9 C10 H8 1.435 109.508 57.908 104.890 0.981
 IC H5 C8 N1 C7 0.956 111.696 107.518 111.218 1.341
 IC C7 O2 C9 H4 1.340 111.068 109.320 112.364 0.954
 IC H6 C8 C9 O2 0.961 111.805 131.878 104.341 1.435
 IC C8 C9 C10 N2 1.546 113.885 -178.033 113.085 1.458
 IC H7 C10 N2 C11 0.938 112.050 19.494 122.796 1.331
 IC C3 C4 N1 C7 1.395 121.589 20.839 127.146 1.341
 IC C8 C9 C10 N2 1.546 113.885 -178.033 113.085 1.458
 IC O2 C9 C10 N2 1.435 109.508 -61.655 113.085 1.458
 IC N3 C14 C13 O4 1.471 111.040 -55.457 114.713 1.358
 IC N3 C15 C16 O4 1.470 110.885 56.099 114.394 1.407
 IC C7 O2 C9 C10 1.340 111.068 -132.244 109.508 1.486
 IC N1 C8 C9 C10 1.474 100.960 131.941 113.885 1.486
 !IC O2 C9 C10 N2 1.435 109.508 -61.655 113.085 1.458
 IC C8 C9 C10 N2 1.546 113.885 -178.033 113.085 1.458
 IC C10 N2 C11 C12 1.458 122.796 -178.341 116.685 1.494
 IC H4 C9 C10 N2 0.954 106.739 60.221 113.085 1.458
 IC O1 O2 *C7 N1 1.196 122.451 180.000 110.654 1.341
 IC C3 C5 *C4 N1 1.395 118.327 180.000 120.059 1.425
 IC C2 C4 *C3 H1 1.355 118.878 180.000 119.093 1.002
 IC C4 C6 *C5 H2 1.379 119.999 180.000 119.226 1.033
 IC C1 C5 *C6 H3 1.357 122.652 180.000 119.904 0.964
 IC C1 C3 *C2 F1 1.378 124.447 180.000 114.144 1.361
 IC C2 C6 *C1 N3 1.378 115.668 180.000 124.786 1.417
 IC C12 N2 *C11 O3 1.494 116.685 180.000 122.204 1.235
 IC C8 C7 *N1 C4 1.474 111.218 180.000 127.146 1.425
 IC C11 C10 *N2 H9 1.331 122.796 180.000 117.562 0.982

2.2 από το Swissparam (αυτόματη παραμετροποίηση)

MASS 201 CB 12.011000
 MASS 202 CR 12.011000
 MASS 203 HCMM 1.007940
 MASS 204 C=O 12.011000
 MASS 205 O=C 15.999400
 MASS 206 NC=O 14.006700

MASS	207	HNCO	1.007940
MASS	208	OR	15.999400
MASS	209	F	18.998400
MASS	210	NC=C	14.006700

RESI ZLD 0.000

GROUP

ATOM	C4	CB	0.1170
ATOM	C3	CB	-0.1500
ATOM	C2	CB	0.1900
ATOM	C1	CB	0.1000
ATOM	C6	CB	-0.1500
ATOM	C5	CB	-0.1500
ATOM	C12	CR	0.0610
ATOM	H10	HCMM	0.0000
ATOM	H11	HCMM	0.0000
ATOM	H12	HCMM	0.0000
ATOM	C11	C=O	0.5690
ATOM	O3	O=C	-0.5700
ATOM	N2	NC=O	-0.7301
ATOM	H9	HNCO	0.3700
ATOM	C10	CR	0.3001
ATOM	H7	HCMM	0.0000
ATOM	H8	HCMM	0.0000
ATOM	C9	CR	0.2800
ATOM	H4	HCMM	0.0000
ATOM	O2	OR	-0.4300
ATOM	C7	C=O	0.7800
ATOM	O1	O=C	-0.5700
ATOM	C8	CR	0.3001
ATOM	H5	HCMM	0.0000
ATOM	H6	HCMM	0.0000
ATOM	N1	NC=O	-0.4771
ATOM	H1	HCMM	0.1500
ATOM	F1	F	-0.1900
ATOM	H3	HCMM	0.1500
ATOM	H2	HCMM	0.1500
ATOM	N3	NC=C	-0.8382
ATOM	C14	CR	0.3691
ATOM	H18	HCMM	0.0000
ATOM	H17	HCMM	0.0000
ATOM	C13	CR	0.2800
ATOM	H19	HCMM	0.0000
ATOM	H20	HCMM	0.0000
ATOM	O4	OR	-0.5600
ATOM	C16	CR	0.2800
ATOM	H13	HCMM	0.0000
ATOM	H14	HCMM	0.0000
ATOM	C15	CR	0.3691
ATOM	H15	HCMM	0.0000
ATOM	H16	HCMM	-0.0000
BOND	C11	C12	
BOND	C11	N2	
BOND	C10	N2	
BOND	C10	C9	
BOND	C8	C9	
BOND	C8	N1	
BOND	C4	N1	
BOND	C4	C5	

BOND	C5	H2		
BOND	C5	C6		
BOND	C6	H3		
BOND	C1	C6		
BOND	C1	N3		
BOND	C15	N3		
BOND	C15	H16		
BOND	C15	H15		
BOND	C15	C16		
BOND	C16	H14		
BOND	C16	H13		
BOND	C16	O4		
BOND	C13	O4		
BOND	C13	H20		
BOND	C13	H19		
BOND	C13	C14		
BOND	C14	H17		
BOND	C14	H18		
BOND	C14	N3		
BOND	C1	C2		
BOND	C2	F1		
BOND	C2	C3		
BOND	C3	H1		
BOND	C3	C4		
BOND	C7	N1		
BOND	C7	O1		
BOND	C7	O2		
BOND	C9	O2		
BOND	C8	H6		
BOND	C8	H5		
BOND	C9	H4		
BOND	C10	H8		
BOND	C10	H7		
BOND	H9	N2		
BOND	C11	O3		
BOND	C12	H12		
BOND	C12	H11		
BOND	C12	H10		
IMPH	C4	C3	N1	C5
IMPH	C3	C2	C4	H1
IMPH	C2	C1	C3	F1
IMPH	C5	C6	C4	H2
IMPH	N1	C8	C4	C7
IMPH	C8	C9	N1	H6
IMPH	C8	C9	N1	H5
IMPH	C9	C10	C8	O2
IMPH	C9	C10	C8	H4
IMPH	C10	N2	C9	H8
IMPH	C10	N2	C9	H7
IMPH	N2	C11	C10	H9
IMPH	C11	O3	N2	C12
IMPH	C12	H12	C11	H11
IMPH	C12	H12	C11	H10
IMPH	C7	O2	N1	O1
IMPH	C6	C1	C5	H3
IMPH	C1	C6	C2	N3
IMPH	N3	C14	C1	C15
IMPH	C14	C13	N3	H17
IMPH	C14	C13	N3	H18
IMPH	C13	O4	C14	H20
IMPH	C13	O4	C14	H19

IMPH	C15	C16	N3	H16					
IMPH	C15	H16	N3	H15					
IMPH	C16	O4	C15	H14					
IMPH	C16	H14	C15	H13					
IC	C4	C3	C2	C1	1.40	118.88	2.06	124.45	1.38
IC	C4	C3	C2	F1	1.40	118.88	176.66	114.14	1.36
IC	C4	C5	C6	C1	1.38	120.00	0.93	122.65	1.36
IC	C4	C5	C6	H3	1.38	120.00	177.43	119.90	0.96
IC	C4	N1	C7	O2	1.43	127.15	176.97	110.65	1.34
IC	C4	N1	C7	O1	1.43	127.15	-3.03	126.89	1.20
IC	C4	N1	C8	C9	1.43	120.93	177.00	100.96	1.55
IC	C4	N1	C8	H5	1.43	120.93	-63.49	111.70	0.96
IC	C4	N1	C8	H6	1.43	120.93	57.88	112.04	0.96
IC	C3	C4	C5	C6	1.40	118.33	-0.19	120.00	1.39
IC	C3	C4	C5	H2	1.40	118.33	-179.53	120.77	1.03
IC	C3	C4	N1	C7	1.40	121.59	20.84	127.15	1.34
IC	C3	C4	N1	C8	1.40	121.59	-169.70	120.93	1.47
IC	C3	C2	C1	C6	1.36	124.45	-1.32	115.67	1.36
IC	C3	C2	C1	N3	1.36	124.45	177.43	119.53	1.42
IC	C2	C3	C4	C5	1.36	118.88	-1.22	118.33	1.38
IC	C2	C3	C4	N1	1.36	118.88	176.99	121.59	1.43
IC	C2	C1	C6	C5	1.38	115.67	-0.21	122.65	1.39
IC	C2	C1	C6	H3	1.38	115.67	-176.79	117.36	0.96
IC	C2	C1	N3	C14	1.38	119.53	61.27	115.83	1.47
IC	C2	C1	N3	C15	1.38	119.53	-169.69	116.26	1.47
IC	C1	C2	C3	H1	1.38	124.45	179.46	121.98	1.00
IC	C1	C6	C5	H2	1.36	122.65	-179.72	119.23	1.03
IC	C1	N3	C14	H18	1.42	115.83	69.18	112.32	1.03
IC	C1	N3	C14	H17	1.42	115.83	-49.25	117.58	0.96
IC	C1	N3	C14	C13	1.42	115.83	-174.85	111.04	1.51
IC	C1	N3	C15	C16	1.42	116.26	174.22	110.89	1.49
IC	C1	N3	C15	H15	1.42	116.26	-70.52	108.09	0.99
IC	C1	N3	C15	H16	1.42	116.26	48.42	114.04	0.93
IC	C6	C1	C2	F1	1.36	115.67	-175.56	121.18	1.36
IC	C6	C1	N3	C14	1.36	124.79	-120.11	115.83	1.47
IC	C6	C1	N3	C15	1.36	124.79	8.94	116.26	1.47
IC	C6	C5	C4	N1	1.39	120.00	-178.43	120.06	1.43
IC	C5	C4	C3	H1	1.38	118.33	-178.69	119.09	1.00
IC	C5	C4	N1	C7	1.38	120.06	-160.98	127.15	1.34
IC	C5	C4	N1	C8	1.38	120.06	8.49	120.93	1.47
IC	C5	C6	C1	N3	1.39	122.65	-178.89	124.79	1.42
IC	C12	C11	N2	H9	1.49	116.68	29.50	113.71	0.98
IC	C12	C11	N2	C10	1.49	116.68	-178.34	122.80	1.46
IC	H10	C12	C11	O3	1.00	109.77	151.66	121.08	1.23
IC	H10	C12	C11	N2	1.00	109.77	-30.45	116.68	1.33
IC	H11	C12	C11	O3	0.92	114.13	30.96	121.08	1.23
IC	H11	C12	C11	N2	0.92	114.13	-151.15	116.68	1.33
IC	H12	C12	C11	O3	0.97	110.97	-94.45	121.08	1.23
IC	H12	C12	C11	N2	0.97	110.97	83.43	116.68	1.33
IC	C11	N2	C10	H7	1.33	122.80	19.49	112.05	0.94
IC	C11	N2	C10	H8	1.33	122.80	139.17	109.75	0.98
IC	C11	N2	C10	C9	1.33	122.80	-104.10	113.09	1.49
IC	O3	C11	N2	H9	1.23	122.20	-152.64	113.71	0.98
IC	O3	C11	N2	C10	1.23	122.20	-0.48	122.80	1.46
IC	N2	C10	C9	H4	1.46	113.09	60.22	106.74	0.95
IC	N2	C10	C9	O2	1.46	113.09	-61.66	109.51	1.43
IC	N2	C10	C9	C8	1.46	113.09	-178.03	113.89	1.55
IC	H9	N2	C10	H7	0.98	117.56	170.66	112.05	0.94
IC	H9	N2	C10	H8	0.98	117.56	-69.67	109.75	0.98
IC	H9	N2	C10	C9	0.98	117.56	47.06	113.09	1.49
IC	C10	C9	O2	C7	1.49	109.51	-132.24	111.07	1.34

IC C10	C9	C8	H5	1.49	113.89	12.85	112.28	0.96
IC C10	C9	C8	H6	1.49	113.89	-108.77	111.80	0.96
IC C10	C9	C8	N1	1.49	113.89	131.94	100.96	1.47
IC H7	C10	C9	H4	0.94	108.94	-65.07	106.74	0.95
IC H7	C10	C9	O2	0.94	108.94	173.05	109.51	1.43
IC H7	C10	C9	C8	0.94	108.94	56.68	113.89	1.55
IC H8	C10	C9	H4	0.98	104.89	179.78	106.74	0.95
IC H8	C10	C9	O2	0.98	104.89	57.91	109.51	1.43
IC H8	C10	C9	C8	0.98	104.89	-58.47	113.89	1.55
IC C9	O2	C7	O1	1.43	111.07	-177.43	122.45	1.20
IC C9	O2	C7	N1	1.43	111.07	2.57	110.65	1.34
IC C9	C8	N1	C7	1.55	100.96	-11.99	111.22	1.34
IC H4	C9	O2	C7	0.95	112.36	109.32	111.07	1.34
IC H4	C9	C8	H5	0.95	110.13	132.70	112.28	0.96
IC H4	C9	C8	H6	0.95	110.13	11.08	111.80	0.96
IC H4	C9	C8	N1	0.95	110.13	-108.21	100.96	1.47
IC O2	C9	C8	H5	1.43	104.34	-106.51	112.28	0.96
IC O2	C9	C8	H6	1.43	104.34	131.88	111.80	0.96
IC O2	C9	C8	N1	1.43	104.34	12.59	100.96	1.47
IC O2	C7	N1	C8	1.34	110.65	6.66	111.22	1.47
IC C7	O2	C9	C8	1.34	111.07	-9.97	104.34	1.55
IC C7	N1	C8	H5	1.34	111.22	107.52	111.70	0.96
IC C7	N1	C8	H6	1.34	111.22	-131.11	112.04	0.96
IC O1	C7	N1	C8	1.20	126.89	-173.34	111.22	1.47
IC N1	C4	C3	H1	1.43	121.59	-0.48	119.09	1.00
IC N1	C4	C5	H2	1.43	120.06	2.23	120.77	1.03
IC H1	C3	C2	F1	1.00	121.98	-5.95	114.14	1.36
IC F1	C2	C1	N3	1.36	121.18	3.19	119.53	1.42
IC H3	C6	C1	N3	0.96	117.36	4.54	124.79	1.42
IC H3	C6	C5	H2	0.96	119.90	-3.23	119.23	1.03
IC N3	C14	C13	H19	1.47	111.04	-179.77	112.81	0.95
IC N3	C14	C13	H20	1.47	111.04	62.29	105.12	0.96
IC N3	C14	C13	O4	1.47	111.04	-55.46	114.71	1.36
IC N3	C15	C16	O4	1.47	110.89	56.10	114.39	1.41
IC N3	C15	C16	H13	1.47	110.89	-66.26	104.35	0.94
IC N3	C15	C16	H14	1.47	110.89	179.45	106.01	0.97
IC C14	N3	C15	C16	1.47	108.41	-53.24	110.89	1.49
IC C14	N3	C15	H15	1.47	108.41	62.02	108.09	0.99
IC C14	N3	C15	H16	1.47	108.41	-179.04	114.04	0.93
IC C14	C13	O4	C16	1.51	114.71	54.44	110.01	1.41
IC H18	C14	N3	C15	1.03	112.32	-63.59	108.41	1.47
IC H18	C14	C13	H19	1.03	103.99	-58.76	112.81	0.95
IC H18	C14	C13	H20	1.03	103.99	-176.70	105.12	0.96
IC H18	C14	C13	O4	1.03	103.99	65.56	114.71	1.36
IC H17	C14	N3	C15	0.96	117.58	177.98	108.41	1.47
IC H17	C14	C13	H19	0.96	108.38	49.65	112.81	0.95
IC H17	C14	C13	H20	0.96	108.38	-68.29	105.12	0.96
IC H17	C14	C13	O4	0.96	108.38	173.96	114.71	1.36
IC C13	C14	N3	C15	1.51	111.04	52.38	108.41	1.47
IC C13	O4	C16	H13	1.36	110.01	63.03	111.71	0.94
IC C13	O4	C16	H14	1.36	110.01	-175.54	111.56	0.97
IC C13	O4	C16	C15	1.36	110.01	-55.23	114.39	1.49
IC H19	C13	O4	C16	0.95	108.06	-178.77	110.01	1.41
IC H20	C13	O4	C16	0.96	107.41	-62.01	110.01	1.41
IC O4	C16	C15	H15	1.41	114.39	-60.73	105.56	0.99
IC O4	C16	C15	H16	1.41	114.39	-176.28	110.72	0.93
IC H13	C16	C15	H15	0.94	104.35	176.91	105.56	0.99
IC H13	C16	C15	H16	0.94	104.35	61.37	110.72	0.93
IC H14	C16	C15	H15	0.97	106.01	62.63	105.56	0.99
IC H14	C16	C15	H16	0.97	106.01	-52.92	110.72	0.93
IC C3	N1	*C4	C5	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00

IC C2	C4	*C3	H1	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C1	C3	*C2	F1	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C6	C4	*C5	H2	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C8	C4	*N1	C7	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C9	N1	*C8	H6	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC C9	N1	*C8	H5	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC C10	C8	*C9	O2	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC C10	C8	*C9	H4	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC N2	C9	*C10	H8	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC N2	C9	*C10	H7	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC C11	C10	*N2	H9	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC O3	N2	*C11	C12	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC H12	C11	*C12	H11	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC H12	C11	*C12	H10	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC O2	N1	*C7	O1	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C1	C5	*C6	H3	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C6	C2	*C1	N3	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C14	C1	*N3	C15	0.00	0.00	180.00	0.00	0.00
IC C13	N3	*C14	H17	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC C13	N3	*C14	H18	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC O4	C14	*C13	H20	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC O4	C14	*C13	H19	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC C16	N3	*C15	H16	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC H16	N3	*C15	H15	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00
IC O4	C15	*C16	H14	0.00	0.00	120.00	0.00	0.00
IC H14	C15	*C16	H13	0.00	0.00	-120.00	0.00	0.00

3. Το αρχείο παραμέτρων της λινεζολίδης

3.1 από τη μη αυτόματη παραμετροποίηση

BONDS

!

!V(bond) = Kb(b - b0)**2

!

!Kb: kcal/mole/A**2

!b0: A

!

!atom type Kb b0

CN1T OS	525.000	1.340
CT1 OS	150.000	1.435
CT2 NN2B	220.000	1.470
CA CN5	400.000	1.395
CA FN1	420.000	1.361
CT3 CE	250.000	1.494
CE O	620.000	1.235
CA CN7	305.000	1.335
CN7 FN1	420.000	1.361
CN5 CN7	302.000	1.378
CE NH1	370.000	1.331

ANGLES

!

!V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2

!

!V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2

```

!
!Ktheta: kcal/mole/rad**2
!Theta0: degrees
!Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
!S0: A
!
!atom types      Ktheta      Theta0      Kub      S0
CT3  CE  NH1  80.000  116.685
NH1  CE  O    80.000  122.204
CT1  CT2  NH1  70.000  113.085
ON1  CN1T  OS  100.000  122.451
CT2  CT1  OS  75.700  109.508
HA   CT1  OS  45.900  112.364
CN1T OS   CT1  40.000  111.068
CN1T NN2B CT2  45.000  111.218
CT2  CT1  CT2  53.350  113.885
HA   CT2  NN2B 51.500  111.696
CT1  CT2  NN2B 70.000  100.960
NN2B CN1T OS  100.000  110.654
CN5  CA   HP  32.000  120.413
CN1T NN2B CN5  70.000  127.146
CN5  NN2B CT2  70.000  115.825
CA   CN7  FN1  45.200  114.144
CN7  CN5  NN2B 81.000  119.533
CA   CN7  CN5  60.000  124.447
CN5  CN7  FN1  60.000  121.185
CT2  CT2  NN2B 70.000  111.040
CT2  NN2B CT2  70.000  108.406
CT2  OH1  CT2  57.500  111.023
CE   O    CE  45.000  111.000
O    CE   O   90.000  125.900
CN1T ON1  CN1T 45.000  111.000
ON1  CN1T ON1  90.000  125.900
CA   CN5  CN7  85.000  115.668
CE   NH1  H    34.000  113.714
CE   CT3  HA   33.000  110.969
CT3  CE   O   80.000  121.076
CE   NH1  CT2  50.000  122.796
CA   CN5  NN2B 81.000  119.533
CN7  CA   HP  30.000  121.979
CN5  CA   CN7  60.000  118.878
CA   CA   CN5  40.000  119.999
CA   CN5  CA   40.000  118.327
DIHEDRALS
!
!V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
!
!Kchi: kcal/mole
!n: multiplicity
!delta: degrees
!
!atom types      Kchi      n      delta
HA   CT3  CE  NH1  0.000  3      0.0

```

HA	CT3	CE	O	-2.000	3	180.0
CE	NH1	CT2	HA	0.0	3	0.00
H	NH1	CE	O	-2.25	2	0.00
O	CE	NH1	CT2	0.00	1	0.00
CT2	NH1	CE	CT3	0.0	1	0.00
CT3	CE	NH1	H	2.25	2	180.00
CT1	CT2	NH1	CE	12.0	1	0.00
CT1	CT2	NN2B	CN5	1.800	5	0.00
CN1T	NN2B	CN5	CA	4.0	2	200.00
CT2	NN2B	CN2	CA	6.0	2	180.00
CN5	NN2B	CT2	HA	1.500	1	180.00
CT2	NN2B	CT2	HA	0.3	1	180.00
CN5	NN2B	CT2	CT2	9.000	2	180.00
CT2	NN2B	CT2	CT2	1.800	1	0.00
NN2B	CT2	CT1	CT2	-4.04	2	0.00
OS	CN1T	NN2B	CN5	1.4	2	180.00
OS	CT1	CT2	HA	0.2	1	0.00
OS	CT1	CT2	NH1	15.04	1	180.00
CT1	CT2	NN2B	CN1T	6.0	2	180.00
CT1	OS	CN1T	NN2B	2.050	5	0.00
CT2	NN2B	CN1T	ON1	1.4	5	0.00
CT1	OS	CN1T	ON1	2.9650	2	180.00
CT1	OS	CN1T	ON1	0.9650	1	0.00
CN1T	NN2B	CT2	HA	1.500	1	180.00
NN2B	CN5	CA	CN7	1.0	2	180.00
NN2B	CN5	CA	HP	0.195	2	180.00
CN5	CN7	CA	CN5	11.0	2	180.00
CN5	CA	CN7	FN1	3.1	2	180.00
CN5	CA	CN2	CA	3.1	1	180.00
CA	CN7	CN5	CA	3.1	2	180.00
CA	CN5	CA	HP	4.2	2	180.00
HP	CA	CN7	CN5	3.5	2	180.00
HP	CA	CN7	FN1	4.2	2	180.00
CA	CN5	CA	FN1	3.1	1	180.00
FN1	CA	CN5	NN2B	3.1	2	180.00
CN5	NN2B	CN1T	ON1	1.4	1	180.00
CT2	CT1	OS	CN1T	6.0	5	180.00
CT2	OH1	CT2	CT2	0.4200	3	0.00
HA	CT1	CT2	HA	-5.2	1	180.00
NN2B	CN5	CN7	CA	9.1	2	180.00
CN5	CA	CA	CN5	8.1	1	180.00
NN2B	CN5	CA	CA	9.1	2	180.00
CA	CN5	CA	CA	3.1	1	180.00
CN5	CA	CA	HP	3.5	1	0.00
CN7	CN5	CA	CA	3.1	1	180.00
CN7	CN5	CA	HP	3.5	2	180.00
CN7	CN5	NN2B	CT2	6.0	2	260.00
CN7	CA	CN5	CA	3.1	2	180.00
FN1	CN7	CN5	CA	3.1	2	180.00
FN1	CN7	CN5	NN2B	9.1	2	180.00
H	NH1	CT2	CT1	0.0	1	180.00
CT2	CT1	CT2	NH1	-5.04	1	0.00
CN5	CA	CA	NN2B	50.00	0	0.00
CA	HP	CN7	CN5	50.00	0	0.00
CN7	FN1	CN5	CA	50.00	0	0.00
CN5	NN2B	CN7	CA	50.00	0	0.00
CN1T	NN2B	ON1	OS	110.00	0	0.00
CE	CT3	NH1	O	120.0000	0	0.0000
CT3	HA	CE	HA	20.00	0	0.00
CT2	NH1	CT1	HA	20.00	0	0.00
CT1	CT2	CT2	OS	90.00	0	0.00

CT1	CT2	CT2	HA	20.00	0	0.00
CT2	CT1	NN2B	HA	20.00	0	0.00
NN2B	CT2	CN5	CN1T	40.00	0	0.00
NN2B	CT2	CN5	CT2	40.00	0	0.00
CT2	CT2	NN2B	HA	20.00	0	0.00
CT2	OH1	CT2	HA	20.00	0	0.00
CT2	HA	CT2	HA	20.00	0	0.00
CT2	HA	NN2B	HA	20.00	0	0.00
CA	HP	CN5	CA	50.00	0	0.00
NONBONDED						
CE		0.000000	-0.110000		2.000000	! ALLOW PEP POL ARO

3.2 από το Swissparam (αυτόματη παραμετροποίηση)

BONDS

C=O	CR	301.539	1.4920
C=O	NC=O	419.491	1.3690
CR	NC=O	335.651	1.4360
CR	CR	306.432	1.5080
CB	NC=O	394.519	1.3950
CB	CB	401.068	1.3740
CB	HCMM	381.853	1.0840
CB	NC=C	443.888	1.3980
CR	NC=C	354.218	1.4460
CR	HCMM	342.991	1.0930
CR	OR	363.214	1.4180
CB	F	468.572	1.3420
C=O	O=C	931.963	1.2220
C=O	OR	417.476	1.3550
HNCO	NC=O	479.511	1.0150

ANGLES

CB	CB	CB	48.145	119.9770
CB	CB	NC=O	73.765	117.9180
CB	CB	HCMM	40.517	120.5710
CB	CB	F	78.730	118.0650
CB	CB	NC=C	75.204	121.6330
HCMM	CR	HCMM	37.134	108.8360
HCMM	CR	C=O	46.778	108.3850
CR	C=O	O=C	67.504	124.4100
CR	C=O	NC=O	70.814	112.7350
O=C	C=O	NC=O	65.273	127.1520
C=O	NC=O	HNCO	41.380	120.2770
C=O	NC=O	CR	59.084	119.6000
HNCO	NC=O	CR	39.725	120.0660
NC=O	CR	HCMM	53.255	107.6460
NC=O	CR	CR	75.564	109.9600
HCMM	CR	CR	45.770	110.5490
CR	CR	OR	71.390	108.1330
CR	CR	CR	61.243	109.6080
HCMM	CR	OR	56.205	108.5770
CR	OR	C=O	66.424	108.0550
OR	C=O	O=C	83.120	124.4250
OR	C=O	NC=O	101.112	112.1870
CB	NC=O	C=O	73.621	118.5960
CB	NC=O	CR	74.700	116.3320
CB	NC=C	CR	60.091	107.3490
CR	NC=C	CR	76.571	113.7030
NC=C	CR	HCMM	51.743	109.8700
NC=C	CR	CR	81.321	108.6780

CR OR CR 86.143 106.9260

DIHEDRALS

CB	CB	CB	CB	3.500	2	180.00
CB	CB	CB	F	3.500	2	180.00
CB	CB	CB	HCMM	3.500	2	180.00
CB	NC=O	C=O	OR	3.000	2	180.00
CB	NC=O	C=O	O=C	3.000	2	180.00
CB	NC=O	CR	CR	0.150	3	0.00
CB	NC=O	CR	HCMM	0.150	3	0.00
CB	CB	NC=O	C=O	3.000	2	180.00
CB	CB	NC=O	CR	3.000	2	180.00
CB	CB	CB	NC=C	3.500	2	180.00
CB	CB	CB	NC=O	3.500	2	180.00
CB	CB	NC=C	CR	2.168	2	180.00
CB	CB	NC=C	CR	0.185	3	0.00
CB	NC=C	CR	HCMM	0.165	3	0.00
CB	NC=C	CR	CR	0.125	3	0.00
CR	C=O	NC=O	HNCO	-0.147	1	0.00
CR	C=O	NC=O	HNCO	2.902	2	180.00
CR	C=O	NC=O	HNCO	0.671	3	0.00
CR	C=O	NC=O	CR	0.324	1	0.00
CR	C=O	NC=O	CR	3.079	2	180.00
CR	C=O	NC=O	CR	0.254	3	0.00
HCMM	CR	C=O	O=C	0.330	1	0.00
HCMM	CR	C=O	O=C	-0.704	2	180.00
HCMM	CR	C=O	O=C	0.154	3	0.00
HCMM	CR	C=O	NC=O	-0.206	1	0.00
HCMM	CR	C=O	NC=O	0.346	2	180.00
HCMM	CR	C=O	NC=O	0.043	3	0.00
C=O	NC=O	CR	HCMM	-1.050	1	0.00
C=O	NC=O	CR	HCMM	0.681	2	180.00
C=O	NC=O	CR	HCMM	0.011	3	0.00
C=O	NC=O	CR	CR	-0.513	1	0.00
C=O	NC=O	CR	CR	0.347	2	180.00
C=O	NC=O	CR	CR	0.474	3	0.00
O=C	C=O	NC=O	HNCO	0.718	1	0.00
O=C	C=O	NC=O	HNCO	2.487	2	180.00
O=C	C=O	NC=O	HNCO	-0.227	3	0.00
O=C	C=O	NC=O	CR	-0.160	1	0.00
O=C	C=O	NC=O	CR	3.147	2	180.00
O=C	C=O	NC=O	CR	-0.073	3	0.00
NC=O	CR	CR	HCMM	0.213	3	0.00
NC=O	CR	CR	OR	0.150	3	0.00
NC=O	CR	CR	CR	0.150	3	0.00
HNCO	NC=O	CR	HCMM	-0.308	1	0.00
HNCO	NC=O	CR	HCMM	0.137	3	0.00
HNCO	NC=O	CR	CR	0.276	1	0.00
HNCO	NC=O	CR	CR	-0.190	2	180.00
HNCO	NC=O	CR	CR	0.163	3	0.00
CR	CR	OR	C=O	-0.274	1	0.00
CR	CR	OR	C=O	0.160	3	0.00
CR	CR	CR	HCMM	0.320	1	0.00
CR	CR	CR	HCMM	-0.315	2	180.00
CR	CR	CR	HCMM	0.132	3	0.00
HCMM	CR	CR	HCMM	0.142	1	0.00
HCMM	CR	CR	HCMM	-0.693	2	180.00
HCMM	CR	CR	HCMM	0.157	3	0.00
HCMM	CR	CR	OR	-0.327	1	0.00
HCMM	CR	CR	OR	0.536	2	180.00
HCMM	CR	CR	OR	0.140	3	0.00

CR	OR	C=O	O=C	0.341	1	0.00
CR	OR	C=O	O=C	3.592	2	180.00
CR	OR	C=O	O=C	-0.468	3	0.00
CR	OR	C=O	NC=O	2.750	2	180.00
HCMM	CR	OR	C=O	0.286	1	0.00
HCMM	CR	OR	C=O	-0.152	3	0.00
OR	C=O	NC=O	CR	3.000	2	180.00
NC=O	CB	CB	HCMM	3.500	2	180.00
HCMM	CB	CB	F	3.500	2	180.00
F	CB	CB	NC=C	3.500	2	180.00
HCMM	CB	CB	NC=C	3.500	2	180.00
HCMM	CB	CB	HCMM	3.500	2	180.00
NC=C	CR	CR	HCMM	0.150	3	0.00
NC=C	CR	CR	OR	0.150	3	0.00
CR	NC=C	CR	CR	0.125	3	0.00
CR	NC=C	CR	HCMM	0.125	3	0.00
CR	CR	OR	CR	-0.341	1	0.00
CR	CR	OR	CR	0.378	2	180.00
CR	CR	OR	CR	0.378	3	0.00
CR	OR	CR	HCMM	0.285	1	0.00
CR	OR	CR	HCMM	0.160	2	180.00
CR	OR	CR	HCMM	0.285	3	0.00

IMPROPER

CB	CB	NC=O	CB	2.519	0	0.00
CB	CB	CB	HCMM	1.079	0	0.00
CB	CB	CB	F	2.519	0	0.00
NC=O	CR	CB	C=O	-1.439	0	0.00
CR	CR	NC=O	HCMM	0.000	0	0.00
CR	CR	CR	OR	0.000	0	0.00
CR	CR	CR	HCMM	0.000	0	0.00
CR	NC=O	CR	HCMM	0.000	0	0.00
NC=O	C=O	CR	HNCO	-1.439	0	0.00
C=O	O=C	NC=O	CR	9.284	0	0.00
CR	HCMM	C=O	HCMM	0.000	0	0.00
C=O	OR	NC=O	O=C	9.356	0	0.00
CB	CB	CB	NC=C	3.310	0	0.00
NC=C	CR	CB	CR	-0.360	0	0.00
CR	CR	NC=C	HCMM	0.000	0	0.00
CR	OR	CR	HCMM	0.000	0	0.00
CR	HCMM	NC=C	HCMM	0.000	0	0.00
CR	HCMM	CR	HCMM	0.000	0	0.00

```

NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -
cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
CB      0.000000 -0.070000  1.992400
CR      0.000000 -0.055000  2.175000  0.000000 -0.010000  1.900000
HCMM    0.000000 -0.022000  1.320000
C=O     0.000000 -0.110000  2.000000
O=C     0.000000 -0.120000  1.700000  0.000000 -0.120000  1.400000
NC=O    0.000000 -0.200000  1.850000
HNCO    0.000000 -0.046000  0.224500
OR      0.000000 -0.152100  1.770000
F       0.000000 -0.135000  1.630000
NC=C    0.000000 -0.200000  1.850000

```

4. Τα script που χρησιμοποιήθηκαν

4.1 Το script που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του psf

```
#package require psfgen
topology top_all127_prot_na_ZLD_2.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
```

```
alias atom GUA OP1 O1P
alias atom GUA OP2 O2P
alias atom ADE OP1 O1P
alias atom ADE OP2 O2P
alias atom CYT OP1 O1P
alias atom CYT OP2 O2P
alias atom URA OP1 O1P
alias atom URA OP2 O2P
```

```
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

# B1
segment 7 {
pdb 50S_B_1-878.pdb
  first none
  last none
}
coordpdb 50S_B_1-878.pdb 7
guesscoord

# B2
segment 8 {
pdb 50S_B_898-2094.pdb
  first none
  last none
}
coordpdb 50S_B_898-2094.pdb 8
guesscoord

# B3
segment 9 {
pdb 50S_B_2195-2903.pdb
  first none
  last none
}
coordpdb 50S_B_2195-2903.pdb 9
guesscoord

segment C {
pdb 50S_C.pdb
}
coordpdb 50S_C.pdb C
guesscoord

segment D {
pdb 50S_D.pdb
}
coordpdb 50S_D.pdb D
guesscoord

segment E {
pdb 50S_E.pdb
}
coordpdb 50S_E.pdb E
guesscoord

segment G {
pdb 50S_G.pdb
}
coordpdb 50S_G.pdb G
guesscoord

segment J {
pdb 50S_J.pdb
}
coordpdb 50S_J.pdb J
guesscoord

segment K {
pdb 50S_K.pdb

```



```
}
coordpdb 50S_K.pdb K
guesscoord

segment L {
pdb 50S_L.pdb
}
coordpdb 50S_L.pdb L
guesscoord

segment M {
pdb 50S_M.pdb
}
coordpdb 50S_M.pdb M
guesscoord

segment N {
pdb 50S_N.pdb
}
coordpdb 50S_N.pdb N
guesscoord

segment O {
pdb 50S_O.pdb
}
coordpdb 50S_O.pdb O
guesscoord

segment P {
pdb 50S_P.pdb
}
coordpdb 50S_P.pdb P
guesscoord

segment Q {
pdb 50S_Q.pdb
}
coordpdb 50S_Q.pdb Q
guesscoord

segment R {
pdb 50S_R.pdb
}
coordpdb 50S_R.pdb R
guesscoord

segment S {
pdb 50S_S.pdb
}
coordpdb 50S_S.pdb S
guesscoord

segment T {
pdb 50S_T.pdb
}
coordpdb 50S_T.pdb T
guesscoord

segment U {
pdb 50S_U.pdb
}
}
```

```
coordpdb 50S_U.pdb U
guesscoord

segment V {
pdb 50S_V.pdb
}
coordpdb 50S_V.pdb V
guesscoord

segment W {
pdb 50S_W.pdb
}
coordpdb 50S_W.pdb W
guesscoord

segment X {
pdb 50S_X.pdb
}
coordpdb 50S_X.pdb X
guesscoord

segment Y {
pdb 50S_Y.pdb
}
coordpdb 50S_Y.pdb Y
guesscoord

segment Z {
pdb 50S_Z.pdb
}
coordpdb 50S_Z.pdb Z
guesscoord

segment 0 {
pdb 50S_0.pdb
}
coordpdb 50S_0.pdb 0
guesscoord

segment 1 {
pdb 50S_1.pdb
}
coordpdb 50S_1.pdb 1
guesscoord

segment 2 {
pdb 50S_2.pdb
}
coordpdb 50S_2.pdb 2
guesscoord

segment 3 {
pdb 50S_3.pdb
}
coordpdb 50S_3.pdb 3
guesscoord

segment 4 {
pdb 50S_4.pdb
}
coordpdb 50S_4.pdb 4
```

```

guesscoord

segment 5 {
pdb 50S_MG.pdb
}
coordpdb 50S_MG.pdb 5
guesscoord

#Set segment 6
segment 6 {
pdb 50S_HOH.pdb
}
#Take chain 6
coordpdb 50S_HOH.pdb 6
guesscoord

segment ZLD {
pdb min_ZLD_only_H.pdb
first none
last none
}
coordpdb min_ZLD_only_H.pdb ZLD

#guesscoord

writepdb 50S_wt_ZLD-M.pdb
writepsf 50S_wt_ZLD-M.psf
resetpsf

```

4.2 To script για τη διαλυτοποίηση

```

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 [vecscaled $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 [vecscl [expr 1.0/$mass] $com]
}

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

set psf          50S_wt_ZLD-M.psf
set pdb          50S_wt_ZLD-M.pdb
set box          test_box
set psfDrop      50S_wt_ZLD-M_ws.psf
set pdbDrop      50S_wt_ZLD-M_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 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 10.0
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 6
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

```

4.3 To script για την προσθήκη ιόντων

```

source math.tcl

package require psfgen
package require math

proc additions { newpsf newpdb } {
topology top_all27_prot_na_ZLD.inp

foreach { psf pdb } [lindex [molinfo top get filename] 0] { break }
readpsf $psf
coordpdb $pdb

# figure out how many ions we need
set all [atomselect top all]
set cg [eval vecadd [$all get charge]]
set nions [expr round($cg)]
set sign pos
puts "nions: $nions "
if { $nions < 0 } {
set nions [expr abs($nions)]
set sign neg
}
puts "sign: $sign"

# pick random waters
set sel [atomselect top "name OH2 and not within 5 of (not water)"]
set sellist [$sel list]
set inds [list]
set ntot [$sel num]
for { set i 0 } { $i < $nions } { incr i } {
set thewat [expr int($ntot*[math::random])]
puts "thewat: $thewat"
lappend inds [lindex $sellist $thewat]
}
puts "inds: $inds"

# select the waters to delete
set wat [atomselect top "index $inds"]
puts "size of wat is [$wat num]"

# deleted!
foreach segid [$wat get segid] resid [$wat get resid] {
delatom $segid $resid
}

if { $sign == "pos" } {
puts "adding negative ions"
#set resname CIM
#set aname CL
set resname CLA
set aname CLA
} else {
puts "adding positive ions"
#set resname CIP
#set aname NA
set resname SOD
set aname SOD
}

# Build a new segment

```

```

segment ION {
  first NONE
  last NONE
  for { set i 1 } { $i <= [$wat num] } { incr i } {
    residue $i $resname
  }
}

set ind 1
foreach pos [$wat get {x y z}] {
  coord ION $ind $aname $pos
  incr ind
}
guesscoord
# Write out the new version
writepsf $newpsf
writepdb $newpdb
}

#eval addions $argv

eval addions neutr_LNZ_ws.psf neutr_LNZ_ws.pdb

```

4.4 To script για την ελαχιστοποίηση

```

# NAMD CONFIGURATION FILE FOR 50S_wt_ZLD-M_ws.pdb in water sphere

# protocol params

# initial config
coordinates 50S_wt_ZLD-M_ws.pdb
temperature 300K
seed 12345
outputEnergies 1

# output params
outputname min_50S_wt_ZLD-M_ws
binaryoutput no

# integrator params
timestep 1.0

# force field params
structure 50S_wt_ZLD-M_ws.psf
paraTypeCharmm on
parameters par_cpw_CE_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_ZLD-M_ws.ref
fixedAtomsCol B
```

```
minimize 3000
```

4.5 To script για την εξισορρόπηση

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

## ADJUSTABLE PARAMETERS
#####

binaryrestart no
structure 50S_wt_ZLD-M_ws.psf
Coordinates min_50S_wt_ZLD-M_ws.coor
set temperature 300
set outputname eq_50S_wt_ZLD-M_ws_0
firsttimestep 0

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

# Input
paraTypeCharmm on
parameters par_cpw_CE_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 84.148 -43.258 -101.569
sphericalBCr1 138.0 # distance at which the first boundary
potential begins to act
sphericalBCk1 10 # force constant for the harmonic boundary
potential
sphericalBCexpl 2

# Constraints and restraints
fixedAtoms on
fixedAtomsForces on
fixedAtomsFile 50S_wt_ZLD-M_ws.ref
fixedAtomsCol B

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

# Minimization
#minimize 100
reinitvels $temperature;

run 500; # 1 ps

```

4.6 To script για τον υπολογισμό του RMSD

```

# Load from VMD Main .coord and load in molecule .dcd. (like
A_HOH_ws_min.coord and A_HOH_ws_eq.dcd)
# Run from the command line this script.

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

```