



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Silvia – Maria Franov

Molekularni mehanizmi alosteričke regulacije i otpornosti PBP2a proteina kod MRSA bakterije

Kemijski seminar I

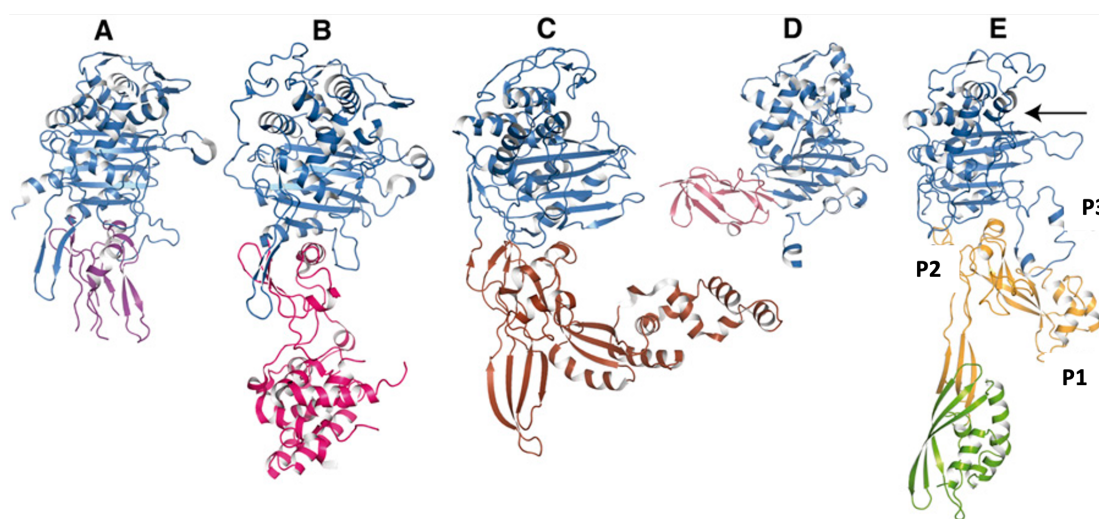
Zagreb, 2025

Sadržaj

§ 1. UVOD	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	3
2.1. Strukturna osnova i alosterička regulacija PBP2a	3
2.1.1. Kristalografski podaci interakcija u aktivnom mjestu	5
2.1.2. Kristalografski podaci interakcija u alosteričkom mjestu	6
2.1.3. Strukturno-dinamički model alosteričke kontrole PBP2a	7
2.2. Molekulska-dinamička nadogradnja alosteričke regulacije PBP2a	9
2.2.1. Ionska mreža kao temelj prijenosa signala	10
2.2.2. Vezne interakcije ceftarolina u alosteričkom i aktivnom mjestu	11
2.3. Zaključak	12
§ 3. LITERATURNI IZVORI	XIII

§ 1. UVOD

Alosterička regulacija jedan je od mehanizama kojim stanice usmjeravaju funkciju enzima putem konformacijskih promjena. Ove promjene rezultat su neizravnih interakcija između različitih veznih mjesta (alosterički učinci) koje se prenose putem strukturnih prijelaza induciranih vezanjem alosteričkog liganda.¹ Primjena ovog načela prepoznaje se i u mehanizmima otpornosti bakterija, uključujući alosteričku regulaciju ključnih enzima poput penicilin-vezujućih proteina u *Staphylococcus aureus*.² Antibiotika rezistencija bakterije *Staphylococcus aureus*, posebice meticilin-rezistentnog soja, jedno je od najznačajnijih područja istraživanja u suvremenoj mikrobiologiji i medicinskoj kemiji.³ Proteini koji vežu penicilin (PBP, od engl. *penicillin-binding proteins*) kod bakterija gram-pozitivne skupine čine skupinu enzima odgovornih za završne korake u sintezi peptidoglikanske mreže – ključne komponente bakterijske stanične stijenke. U bakteriji *Staphylococcus aureus* otpornoj na meticilin (MRSA), klasični PBP-ovi bivaju inhibirani β -laktamskim antibioticima, dok PBP2a, zahvaljujući specifičnoj prostornoj građi aktivnog mjesta, ostaje enzimatski aktivan (Slika 1).^{4,5}



Slika 1. Usporedba struktura penicilin-vezujućih proteina (PBP) bakterija *S. aureus* i *S. pneumoniae*.

Bakterija *S. aureus* posjeduje četiri osnovna PBP-a (PBP1–4) te dodatni PBP2a u MRSA soju. Prikazane su strukture: (A) PBP2x iz *S. pneumoniae*, (B) PBP2, (C) PBP3, (D) PBP4 i (E) PBP2a iz *S. aureus*. Transpeptidazna domena u svim proteinima je označena plavo. PBP2a sadrži tri istaknuta reznja (P1, P2, P3) i uski katalitički džep (strelica), što ga čini otpornim na β -laktamske antibiotike.⁶

Na molekularnoj razini, aktivno mjesto PBP2a uspostavlja izrazito zatvorenu konformaciju, stabiliziranu međudjelovanjem petlji $\alpha 2 - \alpha 3$ i $\beta 3 - \beta 4$ petlji, kao i ključnim ostatcima Tyr446 i Met641, koji djeluju kao „čuvari“ ulaza u katalitičku šupljinu. Ova strukturna ograničenja, u spoju s uskim pristupnim kanalom, onemogućuju β - laktamskim molekulama pristup katalitičkom Ser403, koji je presudan za tvorbu acil-enzimskog prijelaznog kompleksa. Uz prostornu zapreku, aktivno mjesto PBP2a odlikuju i posebnosti električnog naboja. Hidrofobni karakter okoline te prisutnost nepovoljno orijentiranih nabijenih ostataka dodatno narušavaju mogućnost stabilnog vezanja β - laktamskih spojeva. Zanimljivo je da čak i β - laktamski antibiotici s poboljšanim bočnim skupinama (poput oksacilina ili cefaleksina), koji kod ostalih PBP - ova iskazuju povećani afinitet veze, ne uspijevaju savladati ovu konformacijsku barijeru PBP2a. Time bakterija zadržava transpeptidacijsku aktivnost i neometano nastavlja sintezu novih peptidoglikanskih lanaca čak i u prisutnosti inhibitora.^{2,7}

Zbog ove strukturne otpornosti, MRSA sojevi pokazuju izraženu otpornost na široki raspon β - laktamskih antibiotika, uključujući penicilin, meticilin te cefalosporine ranijih generacija. U uvjetima ograničenog izbora djelotvornih lijekova, liječenje infekcija izazvanih MRSA sojevima najčešće su se provodila uporabom glikopeptidnih antibiotika (primjerice vankomicina), linezolida ili daptomicina.⁸ Međutim, navedeni lijekovi nerijetko uzrokuju ozbiljne nuspojave, slabiju sposobnost prodiranja u određena tkiva te usporeno početno djelovanje. Iz navedenih ograničenja, znanstvena zajednica i farmaceutski sektor usmjerili su napore prema traženju slabih točaka u samoj strukturi PBP2a, osobito prema identifikaciji alosteričkih regija koje bi mogle omogućiti ponovno uspostavljanje osjetljivosti bakterije na β - laktamske antibiotike

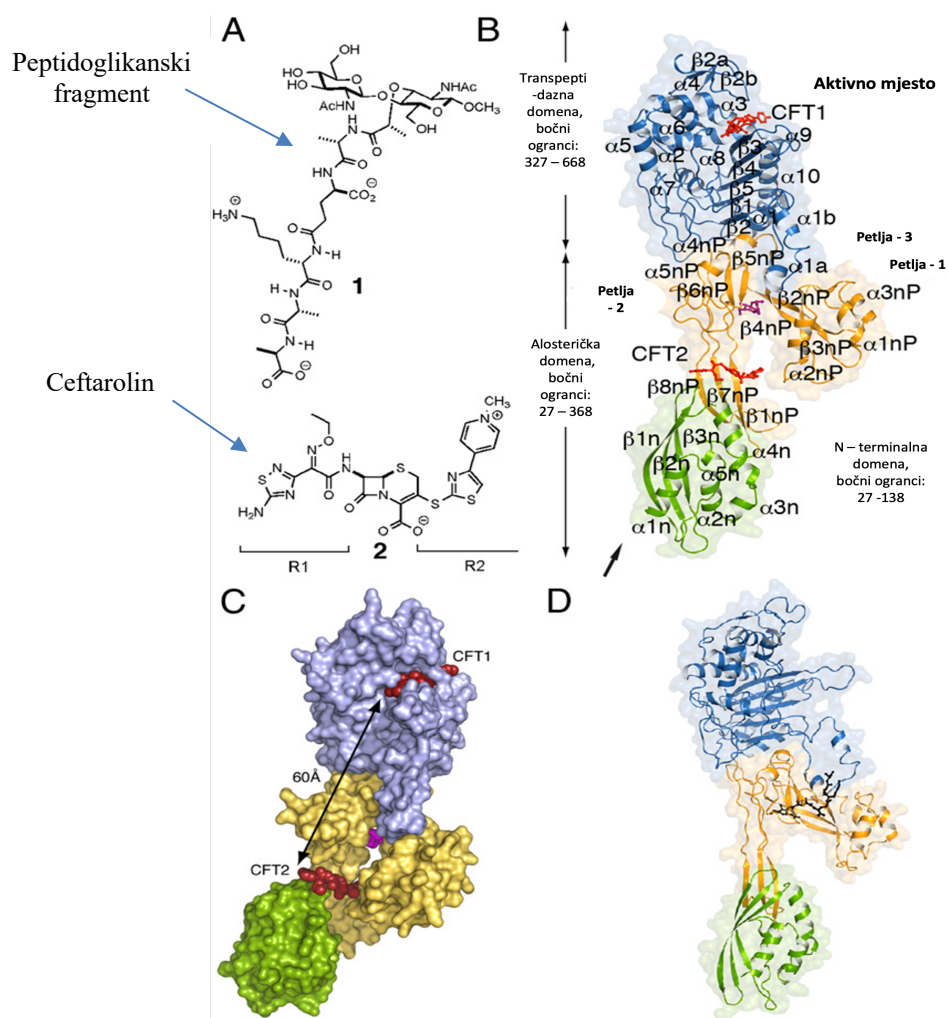
Prekretnicu u razumijevanju mehanizma otpornosti MRSA predstavlja otkriće Otera i suradnika, koji su prvi kristalografski dokazali postojanje alosteričkog mjesta unutar PBP2a proteina. Njihovo istraživanje iz 2013. godine po prvi put opisuje kako alosteričko vezanje molekula, poput ceftarolina – cefalosporina pete generacije – uzrokuje konformacijske promjene koje omogućuju otvaranje inače zatvorenog aktivnog mjesta PBP2a.^{6,9} Ovo otkriće značajno je doprinijelo razumijevanju molekularne osnove rezistencije MRSA sojeva na β - laktamske antibiotike. Temeljni rezultati Oterova tima dodatno su potvrđeni i produbljeni novijim istraživanjem Jiao i suradnika, koji su primjenom simulacija molekulske dinamike i bioinformatičkih metoda detaljno prikazali kinetiku i prijenos alosteričkog signala unutar PBP2a te time dodatno učvrstili model alosteričke regulacije ovog enzima.¹⁰

Cilj seminara je objediniti i protumačiti dobivene rezultate s naglaskom na strukturnu biologiju, molekularne mehanizme prijenosa alosteričkog signala te farmakološka svojstva ceftarolina.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Strukturna osnova i alosterička regulacija PBP2a

Otpornost meticilin - otpornog soja *Staphylococcus aureus* (MRSA) desetljećima se smatrala posljedicom strukturne zatvorenosti aktivnog mjesta enzima PBP2a, što fizički onemogućava pristup β - laktamskim antibioticima. Međutim, Otero i suradnici (2013) su ponudili novo tumačenje tog fenomena otkrivši kako PBP2a sadrži funkcionalno alosteričko mjesto koje posredno regulira dostupnost katalitičkog centra enzima. Kristalografskom analizom visoke razlučivosti (1,9 Å) te nizom biokemijskih i kinetičkih ispitivanja, autori su utvrdili da se alosteričko mjesto nalazi unutar sekundarne domene koja ne veže penicilin, na približno 60 Å udaljenosti od aktivnog mjesta transpeptidazne domene. Ovo mjesto sposobno je stabilno vezati i prirodne fragmente peptidoglikana i ceftarolina, cefalosporinskog antibiotika pete generacije osmišljenog upravo za inhibiciju PBP2a. Strukturnom analizom utvrđeno je da oksazolidinonski prsten i tiazolilna skupina ceftarolina omogućuju učinkovito stabiliziranje molekule u alosteričkom džepu PBP2a, čime potiču konformacijske promjene potrebne za otvaranje aktivnog mjesta. Na prikazu slike 2A nalaze se kemijske strukture prirodnog peptidoglikanskog fragmenta (1) i ceftarolina (2), pri čemu su označene ključne funkcionalne skupine odgovorne za stabilnost interakcije unutar alosteričkog mjesta.

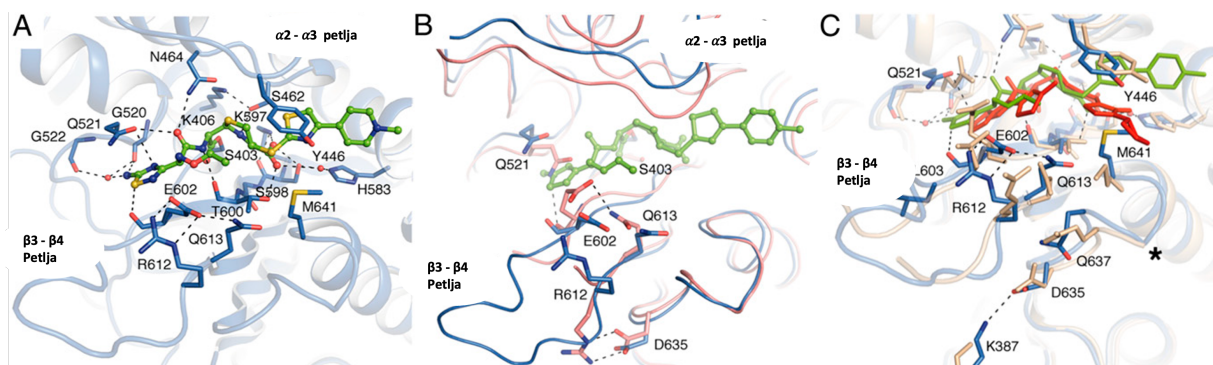


Slika 2. Kemijske strukture prirodnog peptidoglikanskog fragmenta i ceftarolina s označenim ključnim funkcionalnim skupinama koje sudjeluju u stabilizaciji unutar alosteričkog mjesta PBP2a.⁶

Organizacija PBP2a enzima jasno pokazuje podjelu na dvije funkcionalne cjeline – alosteričku domenu (Petlja - 1 i Petlja - 2) te transpeptidaznu domenu (Petlja - 3) unutar koje je smješten katalitički Ser403. Upravo su unutar Petlje - 1 i Petlje - 2 locirana alosterička mjesta (CFT2), dok se aktivno mjesto (CFT1) nalazi u Petlji - 3, prostorno udaljeno 60 Å. Kristalografski prikaz proteina jasno vizualizira ovu strukturnu podjelu te dodatno naglašava važnost mehanizama prijenosa signala koji osiguravaju funkcionalnu povezanost između udaljenih domena (Slika 2B). Prostorna udaljenost između alosteričkog i katalitičkog mjesta dodatno je prikazana površinskim modelom enzima, gdje su oba džepa smještena na suprotnim stranama proteina (Slika 2C). Ovaj prikaz oslikava složenu strukturu PBP2a te objašnjava potrebu za posredovanjem signala kroz unutarnje strukturne cjeline – petlje koje povezuju različite domene.

2.1.1. Kristalografski podaci interakcija u aktivnom mjestu

U fiziološkim uvjetima, bez prisutnosti liganda, PBP2a održava aktivno mjesto u zatvorenoj konformaciji zahvaljujući specifičnom pozicioniranju petlji $\alpha 2 - \alpha 3$ i $\beta 3 - \beta 4$ te „zaštitarskim” ostacima Tyr446 i Met641. Međutim, vezanjem ceftarolina dolazi do aktivacije enzima i otvaranja pristupa katalitičkom Ser403. Molekularna interakcija PBP2a s ceftarolinom u aktivnom mjestu prikazana je kroz tri strukturna uvida na slici 3.



Slika 3. Strukturna analiza interakcija PBP2a s ceftarolinom i ceftobiprolom. (A) Vezanje ceftarolina unutar aktivnog mjesta uz interakcije sa Ser403, Tyr446, Met641 i petljama $\alpha 2 - \alpha 3$ te $\beta 3 - \beta 4$ ploče.

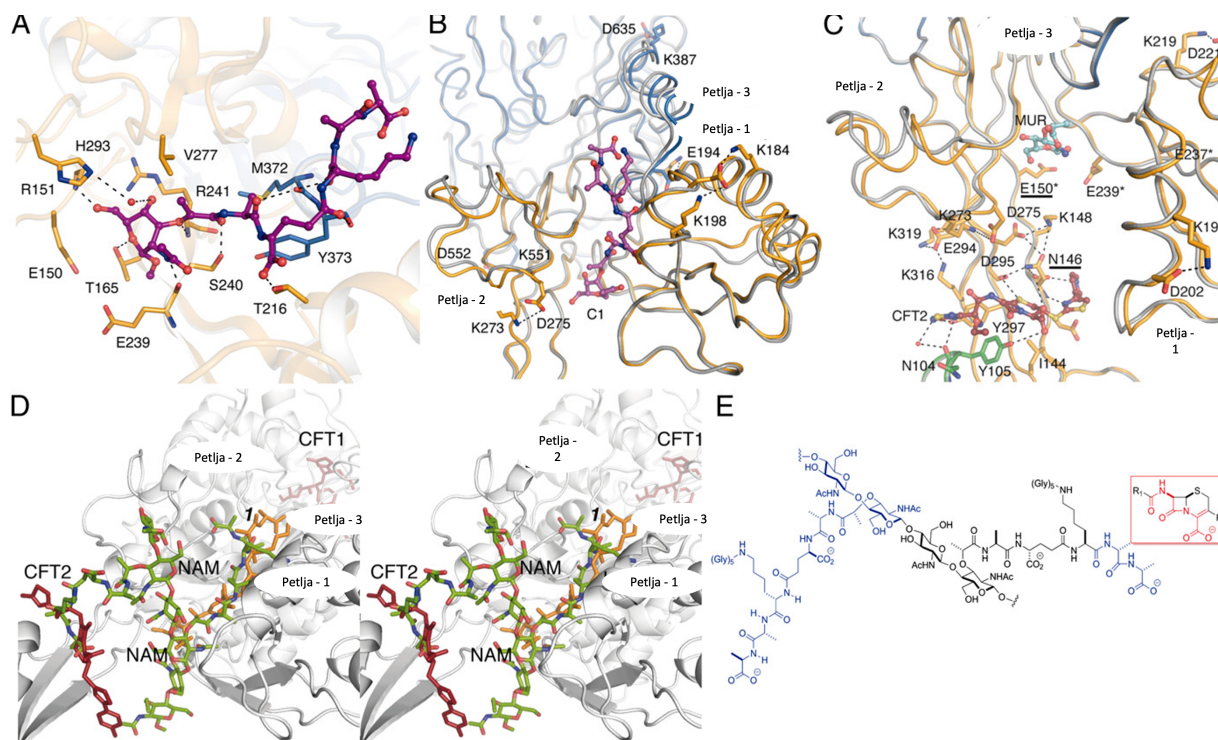
(B) Usporedba zatvorene i otvorene konformacije PBP2a nakon vezanja ceftarolina, s prikazom otvaranja aktivnog mjesta. (C) Superpozicija PBP2a u kompleksima s ceftarolinom i ceftobiprolom te prikaz lokalnih razlika oko ostataka Met641 i Tyr446.⁶

Ceftarolin se precizno pozicionira unutar katalitičkog džepa PBP2a, gdje ostvaruje niz stabilnih interakcija s okolnim aminokiselinским ostacima, uključujući Ser403, Tyr446, Thr600 i Met641. Njegova struktura omogućuje uspostavu vodikovih veza i hidrofobnih kontakata koji osiguravaju učinkovito vezanje u aktivnom mjestu. Oksazolidinonski prsten ceftarolina sudjeluje u polarnoj mreži vodikovih veza, dok tiazolilna skupina ostvaruje dodatne hidrofobne interakcije koje stabiliziraju molekulu u katalitičkom džepu. Konformacijska prilagodba enzima uključuje otvaranje petlji $\alpha 2 - \alpha 3$ i $\beta 3 - \beta 4$ nabranih ploča, čime se deaktivira tzv. „zaštitarska“ funkcija ostataka Tyr446 i Met641, koji u zatvorenom obliku fizički ograničavaju pristup katalitičkom Ser403. Vezanjem ceftarolina dolazi do otključavanja ovih petlji i posljedičnog otvaranja aktivnog mjesta, što omogućuje puni ulazak antibiotika i njegovu optimalnu orijentaciju za inhibiciju transpeptidazne aktivnosti. Usporedba s kompleksom PBP2a i ceftobiprola dodatno ističe posebnost ceftarolina – iako oba antibiotika ostvaruju slične kontakte s katalitičkom domenom, ceftarolin potiče izraženiju reorganizaciju oko ostatka Met641, omogućujući bolje otvaranje aktivnog mjesta. Ceftobiprol, nasuprot tome, ostavlja navedeni ogranak u nešto zatvorenijoj konformaciji, što smanjuje pristupačnost katalitičkog centra. Kristalografski podaci

potvrđuju da ceftarolin, za razliku od ceftobiprola, stabilizira aktivno mjesto PBP2a u otvorenoj konformaciji pogodnoj za inhibiciju, pri čemu ključnu ulogu imaju specifične vodikove veze i hidrofobne interakcije ostvarene unutar katalitičkog džepa.

2.1.2. *Kristalografski podaci interakcija u alosteričkom mjestu*

Interakcije u alosteričnoj domeni PBP2a ključne su za prijenos signala između udaljenih strukturnih regija proteina i regulaciju njegove transpeptidazne aktivnosti. Kristalografski podaci (Slika 4) otkrivaju stabilno vezanje fragmenta peptidoglikana – spoja 1 (magenta) – unutar alosteričnog džepa, gdje ostvaruje vodikove veze s ključnim ostacima Arg241 i Tyr373. Te interakcije stabiliziraju organizaciju Petlji - 1, 2 i 3 koje definiraju arhitekturu ove domene. Vezanjem spoja 1 (magenta) dolazi do stvaranja dodatnih ionskih mostova, uključujući most Glu194 – Lys198, što nije prisutno u slobodnom obliku PBP2a i ukazuje na sposobnost ovog liganda da inducira konformacijske promjene u alosteričnoj domeni. Ceftarolin (tamnocrveno) također zauzima isti alosterični džep, uz prisutnost muramične kiseline (cijan) kao dodatnog liganda. Mutacije N146 i E150, uočene u kliničkim sojevima MRSA, smanjuju afinitet vezanja ceftarolina i povezane su s pojavom otpornosti. Strukturna analiza pokazuje da ceftarolin (tamnocrveno) oponaša terminalni D-Ala-D-Ala motiv peptidoglikana te djeluje kao funkcionalni mimetik prirodnog liganda. Njegovo vezanje u alosterično mjesto uzrokuje pomak Petlji - 1 i 2 za približno 3 Å, destabilizirajući „zaštitarske“ petlje u aktivnom mjestu i omogućujući pristup Ser403 te formiranje stabilnog acil - enzimskog kompleksa.

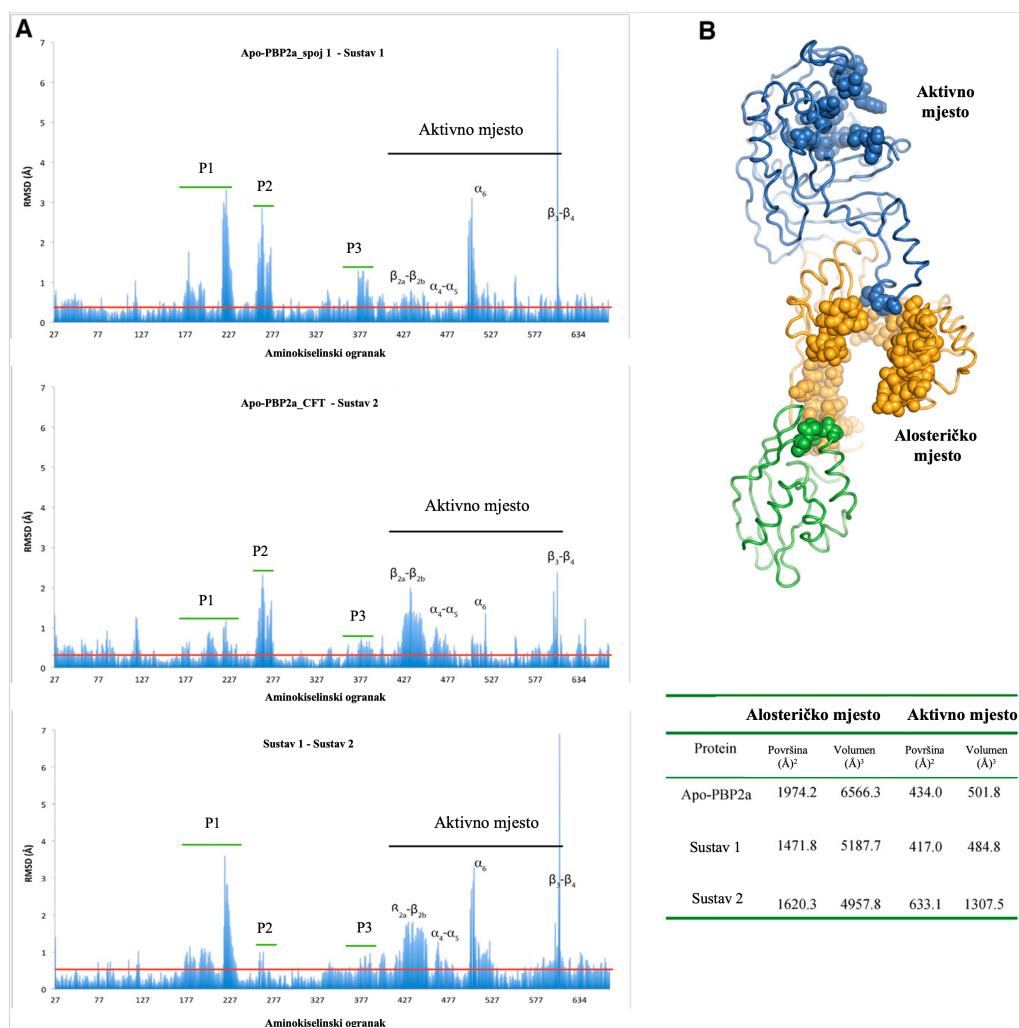


Slika 4. Kristalografski prikaz interakcija u alosteričnom džepu PBP2a. (A) Vezanje peptidoglikanskog fragmenta (spoj 1) uz vodikove veze s Arg241 i Tyr373. (B) Spoj 1 inducira ionijski most Glu194 – Lys198 i pomake petlji. (C) Cefarolin i muramična kiselina u alosteričnom mjestu te mutacije koje smanjuju vezanje cefarolina. (D) Superpozicija spoja 1 i cefarolina uz model peptidoglikanskog lanca. (E) Cefarolin imitira D-Ala-D-Ala kraj peptidoglikana, potvrđujući njegov mimetički učinak.

2.1.3. Strukturno-dinamički model alosteričke kontrole PBP2a

Otero i suradnici su primijenili molekulske dinamičke simulacije (MD) kako bi istražili prijenos alosteričkog signala unutar PBP2a. Njihova analiza pokazala je da vezanje fragmenta peptidoglikana (spoja 1) ili cefarolina (CFT) u alosterično mjesto stabilizira Petlje - 1 (P1) i Petlje - 2 (P2) unutar alosterične domene te izaziva konformacijske promjene koje se prenose prema aktivnom mjestu enzima. MD simulacijom autori su potvrdili mehanički prijenos signala kroz ionske mostove između alosterične i katalitičke domene, oslanjajući se na model „domino efekta”. Identificirali su ključne ionske mostove, uključujući Glu150 – Lys316, Lys273 – Asp275 i Lys387 – Asp635, koji povezuju alosterične regije s transpeptidaznom domenom. Dodatno, simulacije su predvidjele 17 novih ionskih mostova koji nisu bili uočeni u kristalnim strukturama. Važno je istaknuti da su autori rezultate kvantitativno prikazali RMSD analizom i izračunom volumena džepova, bez vizualizacije samih dinamičkih trajektorija. RMSD (eng. *root-mean-square deviation*) grafovi (Slika 5A) prikazuju prosječne pomake (u Ångstromima) pojedinih aminokiselinskih ostataka duž proteina između različitih sustava (apo-protein, sustav 1 i

sustav 2). Viši RMSD vrijednosti ukazuju na izraženiju konformacijsku promjenu određene regije u odnosu na uspoređeni sustav. Na RMSD profilima istaknute su regije P1, P2 i P3 (odgovarajuće petlje alosteričke domene) te područja aktivnog mjesta (nabori ploča $\beta_3 - \beta_4$ i petlje $\alpha_2 - \alpha_3$). Nakon vezanja liganda, vidljive su znatne konformacijske promjene u P1 i P2 te destabilizacija petlji u aktivnom mjestu. Dodatno, analiza volumena džepova (Slika 5B) pokazala je da vezanje ceftarolina (sustav 2) dovodi do povećanja volumena aktivnog mjesta s približno 500 Å³ u apo-strukturi na više od 1300 Å³ u sustavu s vezanim ceftarolinom. Time su Otero i suradnici potvrdili da alosterička aktivacija putem liganda omogućuje otvaranje katalitičkog džepa i izlaganje Ser403.

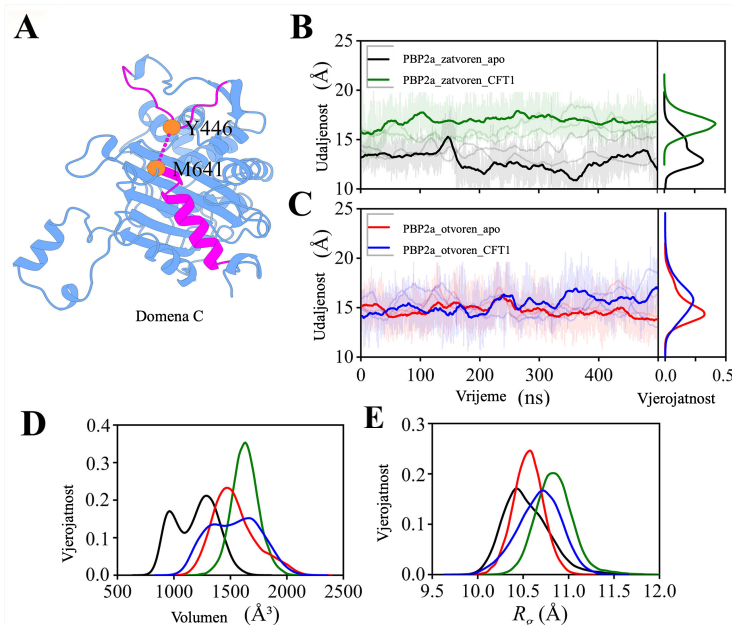


Slika 5. (A) RMSD analiza PBP2a u apo obliku i nakon vezanja spoja 1 ili ceftarolina. Istaknuti su pomaci u alosteričnim petljama (P1–P3) i u regijama aktivnog mjesta (nabori ploča $\beta_3 - \beta_4$ i $\alpha_2 - \alpha_3$ petlje). Povišene RMSD vrijednosti upućuju na konformacijske promjene nakon vezanja liganda. (B)

Prostorni prikaz PBP2a s označenim alosteričnim (zeleno) i aktivnim džepom (plavo) te analiza volumena, koja potvrđuje povećanje aktivnog mjesta nakon vezanja ceftarolina.⁶

2.2. Molekulsko-dinamička nadogradnja alosteričke regulacije PBP2a

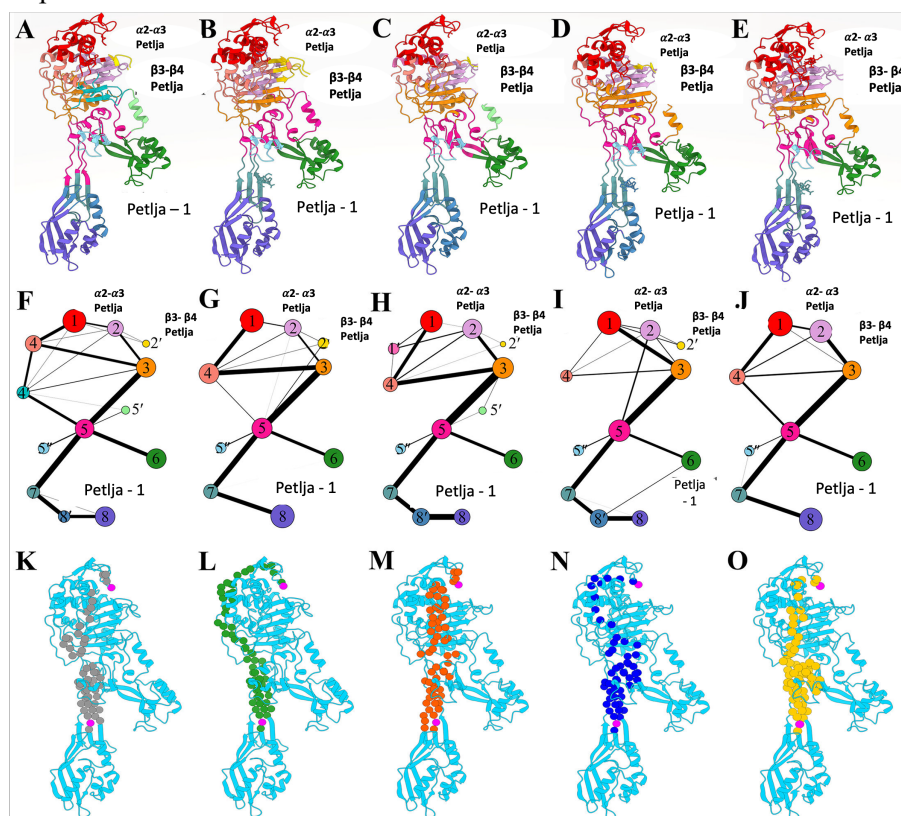
Jiao i suradnici (2023) potvrdili su mehanički model alosteričkog prijenosa signala u PBP2a koji su prethodno predložili Otero i suradnici (2013), ali su ga dodatno proširili kvantificirajući i prikazujući ga u kontekstu konformacijske dinamike proteina.¹⁰ Ključni nalaz njihova rada bio je detaljno praćenje otvaranja aktivnog mjesta PBP2a nakon vezanja ceftarolina u alosterično mjesto, čime su hipoteze Otera i suradnika dobile potvrdu na molekulskoj i funkcionalnoj razini. Korištenjem simulacija molekulske dinamike (500 ns), Jiao i suradnici prikazali su kako vezanje ceftarolina u alosterički džep stabilizira alosteričku domenu (Petlju - 1 i ostatke domene B), smanjujući njezinu fleksibilnost, dok istovremeno uzrokuje povećanu pokretljivost transpeptidazne domene (domena C) i njezinih "zaštitarskih" dijelova ($\alpha 2$ - $\alpha 3$ petlje i $\beta 3$ - $\beta 4$ nabrane ploče) koje omeđuju aktivno mjesto. Najvažniji kvantitativni rezultat njihova rada odnosi se na povećanje udaljenosti između ostataka Y446 i M641 s prosječnih $\sim 13,5$ Å u apo obliku proteina na $\sim 16,5$ Å nakon vezanja ceftarolina (Slika 6B i 6C). Ova promjena omogućuje fizičko otvaranje aktivnog mjesta te pristup drugoj molekuli ceftarolina (CFT2) koja inhibira enzim. Osim udaljenosti između „za“ ostataka, autori su prikazali i značajan rast volumena aktivnog mjesta s približno $500 - 1250$ Å³ u apo stanju na više od 1600 Å³ u prisutnosti ceftarolina, što dodatno potvrđuje alosterički mehanizam otvaranja džepa (Slika 6D). Ovi podaci jasno kvantificiraju konformacijski prijenos signala i potvrđuju „domino efekt“ alosteričke regulacije PBP2a koji su prvotno predložili Otero i suradnici.



Slika 6. Promjena udaljenosti između ostataka Y446 i M641 te volumen aktivnog mjesta PBP2a u prisutnosti i odsutnosti ceftarolina.¹⁰

2.2.1. Ionska mreža kao temelj prijenosa signala

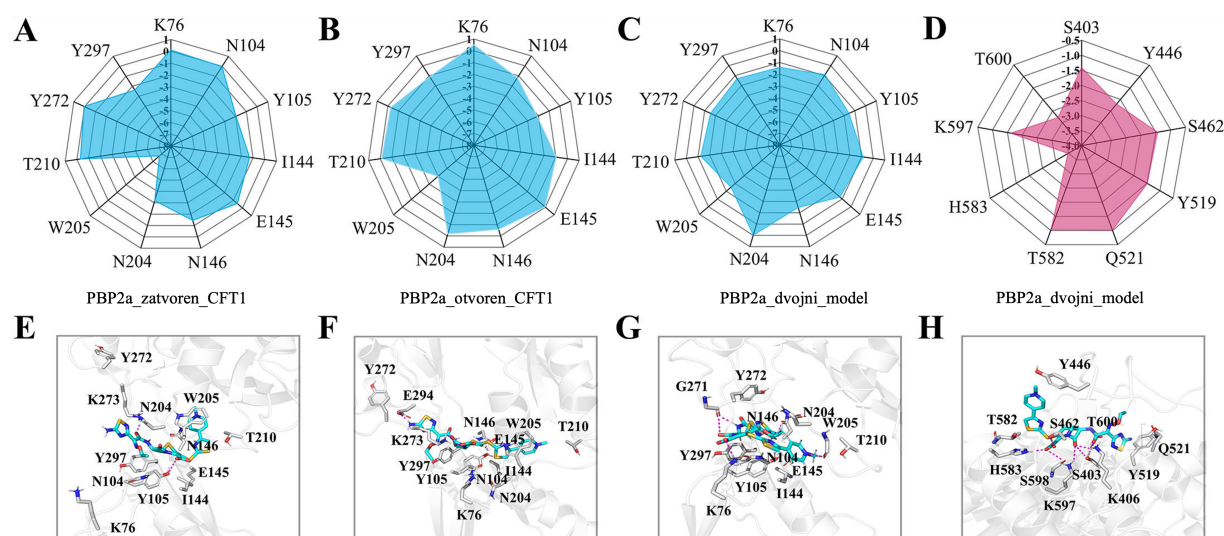
Ionska mreža PBP2a proteina uključuje kritične ostatke kao što su E150, K153, E294 i D635, čija međusobna povezivanja ionskim i vodikovim vezama omogućuju prijenos konformacijskog signala od alosteričkog mjesta prema katalitičkom džepu. Ova mreža prenosi signal od alosteričke petlje prema $\alpha 2$ - $\alpha 3$ petlji koja omeđuje ulaz u aktivno mjesto. Računalne simulacije Jiao tima prikazuju da signal putuje kroz definiranu putanju: R297 (alosterično mjesto) $\rightarrow$ E150 $\rightarrow$ K153 $\rightarrow$ E294 $\rightarrow$ Y446 (aktivno mjesto). U prisutnosti ceftarolina dolazi do stabilizacije alosteričke petlje i jačanja prijenosa signala, pri čemu se smanjuje fleksibilnost alosteričkog dijela, dok $\alpha 2$ - $\alpha 3$ petlje i $\beta 3$ - $\beta 4$ nabrane ploče postaju pokretljivije, omogućujući otvaranje katalitičkog mjesta. Analizom molekulske dinamike prikazana je jača funkcionalna povezanost između domene B (alosterička domena) i domene C (transpeptidazna domena), što je vidljivo kroz skraćene i pojačane signalne putove, prikazano podebljanom linijom u mrežnoj analizi (Slika 7K i 7L). Ovi podaci potvrđuju da vezanje ceftarolina učinkovito sinkronizira konformacijske promjene unutar proteina, olakšavajući otvaranje katalitičkog džepa.



Slika 7. Dinamička mrežna analiza PBP2a u različitim simulacijskim sustavima. Prikazi (A–E) i mrežni grafovi (F–J) prikazuju klastere i prijenos signala, pri čemu deblje linije označuju važnije veze. Paneli (K–O) prikazuju alosterički prijenos signala od R297 do Y446. Vezanje ceftarolina stabilizira i usmjerava signalne putove prema aktivnom mjestu.¹⁰

2.2.2. Vezne interakcije ceftarolina u alosteričkom i aktivnom mjestu

Energetska analiza međudjelovanja (Slika 8) kvantificirala je doprinose ključnih aminokiselinskih ostataka stabilizaciji ceftarolina unutar alosteričkoga i katalitičkoga mjesta proteina PBP2a. „Radarski” višedimenzionalni dijagrami (A – D), dobiveni MM-PBSA (eng. *Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area*) analizom nakon simulacija molekulske dinamike, prikazuju doprinose pojedinih ostataka ukupnoj slobodnoj energiji vezanja u četiri simulacijska modela, pri čemu manji polumjeri označuju povoljnije, odnosno negativnije, energijske doprinose. U alosteričkom mjestu (A–C) ceftarolin uspostavlja stabilna međudjelovanja s ostacima K76, Y105, W205 i Y297, uključujući vodikove veze, elektrostatske interakcije (npr. s K76) te hidrofobne i $\pi - \pi$ interakcije (npr. s Y105 i W205). Ovi podaci potvrđuju stabilnost alosteričkoga vezanja neovisno o konformacijskom stanju (zatvoreno ili otvoreno) te u „dvojnome” modelu u kojemu je ceftarolin istodobno prisutan u oba vezna mjesta. U katalitičkome mjestu „dvojnoga” modela (D) prevladavaju interakcije s katalitički relevantnim ostacima Y446, S462, H583 i T600. Ostatak Y446 uspostavlja vodikovu vezu s aktivnim dijelom ceftarolina, dok H583 i T600 dodatno stabiliziraju ligand putem polarnih interakcija i vodikovih veza. Osim toga, interakcije s ostacima S403, Q521 i K597 dodatno učvršćuju ceftarolin unutar katalitičke šupljine. Donji strukturni prikazi (E–H) vizualiziraju položaj ceftarolina u alosteričkome i katalitičkome mjestu u različitim modelima, naglašavajući prostornu organizaciju navedenih međudjelovanja.



Slika 8. Prikaz ostataka PBP2a uključenih u stabilizaciju ceftarolina u alosteričkom (A-C, E-G) i katalitičkom (D, H) mjestu. Gornji dijelovi prikazuju energijske doprinose pojedinih bočnih ogranaaka vezanju ceftarolina, dok donji dijelovi prikazuju prostorni smještaj ceftarolina unutar alosteričkog i aktivnog mjesta.¹⁰

Dobiveni rezultati upućuju na koordinirani mehanizam vezanja kojim ceftarolin istodobno stabilizira alosteričku i katalitičku domenu, podupirući hipotezu o njegovoj ulozi kao alosteričkoga modulatora i kompetitivnoga inhibitora PBP2a. Utvrđena međudjelovanja potpuno su usklađena s prethodno provedenim dinamičkim i mrežnim analizama koje su pokazale funkcionalnu povezanost između alosteričkoga vezanja i otvaranja katalitičkoga mjesta.

2.3. Zaključak

Otero i suradnici uspostavili su temelj za razumijevanje alosteričke regulacije PBP2a proteina, definirajući ionsku mrežu kao ključnu komponentu prijenosa konformacijskog signala između alosteričkog i katalitičkog mjesta. Pritom su identificirani ključni ostaci, među kojima E150, K153 i Y446, sudjeluju u prostorno organiziranom prijenosu strukturnih promjena potrebnih za otvaranje aktivnog mjesta PBP2a i smanjenje njegove inherentne rezistencije na β -laktamske antibiotike.

Na ovoj osnovi, Jiao i suradnici proširuju model primjenom simulacija molekulske dinamike, koje po prvi put kvantificiraju i dinamički prikazuju tijek prijenosa alosteričkog signala unutar PBP2a u realnom vremenu. Njihovi rezultati potvrđuju da vezanje ceftarolina u alosterično mjesto stabilizira ionsku mrežu te posljedično potiče konformacijsko otvaranje katalitičkog džepa. Kvantitativna analiza ukazuje na povećanje udaljenosti između ostataka Y446 i M641 te značajno proširenje volumena aktivnog mjesta, čime su funkcionalno potvrđeni postulati Oterovog modela alosteričke regulacije.

Dobiveni uvidi otvaraju nova istraživačka i terapijska područja. Osobitu važnost stječu kinazolinonski spojevi, mali molekularni modulatori alosteričkog mjesta PBP2a, koji u kombinaciji s β -laktamskim antibioticima pokazuju sinergistički učinak inhibicije enzima. Istodobno, razvoj dvostrukih inhibitora – molekula sposobnih istodobno ciljati alosterično i katalitičko mjesto – profilira se kao obećavajuća strategija za suzbijanje otpornosti MRSA sojeva.^{11,12}

Zajednički doprinos spoznaja Otera i Jiao tima predstavlja čvrstu znanstvenu osnovu za daljnje istraživanje alosteričke kontrole PBP2a te za usmjereni razvoj novih antimikrobnih terapija protiv rezistentnih bakterijskih infekcija.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. Q. Cui, M. Karplus, *Protein Science* **17** (2008) 1295-1307.
2. J. Fishovitz, J.A. Hermoso, M. Chang, S. Mobashery, *IUBMB Life* **66** (2014) 572–577.
3. J.A. Hermoso, J.M. Monterroso, D. Albert, J. Galán, S. Ahrazem, J.A. García, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) 11127–11132.
4. H.F. Chambers, *Clin. Microbiol. Rev.* **10** (1997) 781–791.
5. A. Radoux, J. Moreau, M. Dufresne, *Cell. Mol. Life Sci.* **63** (2006) 2900–2910.
6. L.H. Otero, A. Rojas-Altuve, L.I. Llarrull, C. Carrasco-López, M. Kumarasiri, E. Lastochkin, J. Fishovitz, M. Dawley, D. Heseck, M. Lee, J.W. Johnson, J.F. Fisher, M. Chang, S. Mobashery, J.A. Hermoso, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (2013) 16808–16813.
7. D. Lim, N.C.J. Strynadka, *Nat. Struct. Biol.* **9** (2002) 870–876.
8. C. Liu, A. Bayer, S.E. Cosgrove, R.S. Daum, S.K. Fridkin, R.J. Gorwitz, et al., *Clin. Infect. Dis.* **52** (2011) e18–e55.
9. M. J. Wilcox, M. Das, A. Harrison, *J. Antimicrob. Chemother.* **66** (2011) iii11–iii18
10. F. Jiao, Y. Bao, M. Li, Y. Zhang, F. Zhang, P. Wang, J. Tao, H.H.Y. Tong, J. Guo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **67** (2023) e00895-23.
11. Z. Peng, Z. Zhang, Y. Jiang, Y. Xu, J. Cai, H. Liu, *J. Med. Chem.* **65** (2022) 10255–10267.