

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДИНАМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭНДОЛИЗИНОВ T5 И PlyG *in silico*

© 2025 г. А.Г. Аракелян*, #, Г.Н. Чуев*, Т.В. Мамедов*, А. Ариков**, К.Р. Исмаилов***

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

**The Agricultural University of Plovdiv, Mendeleev blvd., 12, Plovdiv, 4000, Bulgaria

***Спортивная школа олимпийского резерва по спортивной борьбе,
Большая Нижегородская ул., 43, Владимир Владимирской области, 600020, Россия

#E-mail: arkatsachndir@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2024 г.

После доработки 15.02.2025 г.

Принята к публикации 19.02.2025 г.

Эндолизины бактериофагов – часть комплекса литических ферментов, отвечающая за разрушение пептидогликана клеточной стенки бактерий. В данной работе методами молекулярной динамики и анализа нормальных мод были изучены динамические особенности однодоменного эндолизина бактериофага T5 и многодоменного эндолизина PlyG гамма-фага. Был объяснен механизм активации эндолизина бактериофага T5 кальцием и было обнаружено принципиальное различие в динамических особенностях однодоменных и многодоменных эндолизинов.

Ключевые слова: эндолизин, молекулярная динамика, анализ нормальных мод, активация кальцием, динамические особенности белков.

DOI: 10.31857/S0006302950820082, **EDN:** KZOTQL

Эндолизины, литические ферменты бактериофагов, являются специализированными ферментами, которые разрушают пептидогликан клеточных стенок бактерий на стадии выхода потомства фага из клетки-хозяина.

Высокая специфичность и эффективность эндолизинов бактериофагов позволяют рассматривать эндолизины в качестве потенциальных антибактериальных агентов в сельском хозяйстве, биотехнологии, пищевой промышленности и прочих отраслях. Эти ферменты обладают рядом преимуществ по сравнению с обычными антимикробными средствами, включая целенаправленное действие против определенных патогенов и снижение риска развития резистентности [1–3].

Классификация эндолизинов основана на типе связей, разрушаемых ими в бактериальном пептидогликане. Существует три класса эндолизинов: амидазы, катализирующие разрушение связи между N-ацетилмурамовой кислотой и

связанным с ней L-аланином; гликозидазы, разрушающие β-1,4-гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой; и пептидазы, или эндопептидазы, действующие на связи между определенными аминокислотами, входящими в состав межпептидных мостиков или их пептидных субъединиц [4]. На рис. 1 приведена схема структуры пептидогликана *Escherichia coli* и обозначены связи, разрушаемые эндолизинами различных классов.

Эндолизины могут состоять из одного и более доменов, причем в состав эндолизина обязательно входит хотя бы один каталитически активный домен (enzymatically active domain, EAD), расщепляющий определенные связи в составе пептидогликана. Помимо одного или нескольких EAD, эндолизин может иметь один или несколько субстрат-связывающих доменов (cell wall binding domain, CBD), отвечающих за связывание фермента с пептидогликаном [5]. Домены связаны между собой подвижными участками белковой цепи – линкерами. Было установлено, что даже в отсутствие соответствующих CBD, некоторые EAD многодоменных эндолизинов могут связывать пептидогликан, и важным условием этого является наличие положительного заряда на EAD [6]. В некоторых случаях, эндолизин может иметь

Сокращения: EAD – каталитически активный домен (enzymatically active domain), CBD – субстрат-связывающий домен (cell wall binding domain), МД – молекулярная динамика, АНМ – анализ нормальных мод, RMSF – усредненное по времени среднеквадратичное отклонение координат атомов (root mean square fluctuation).

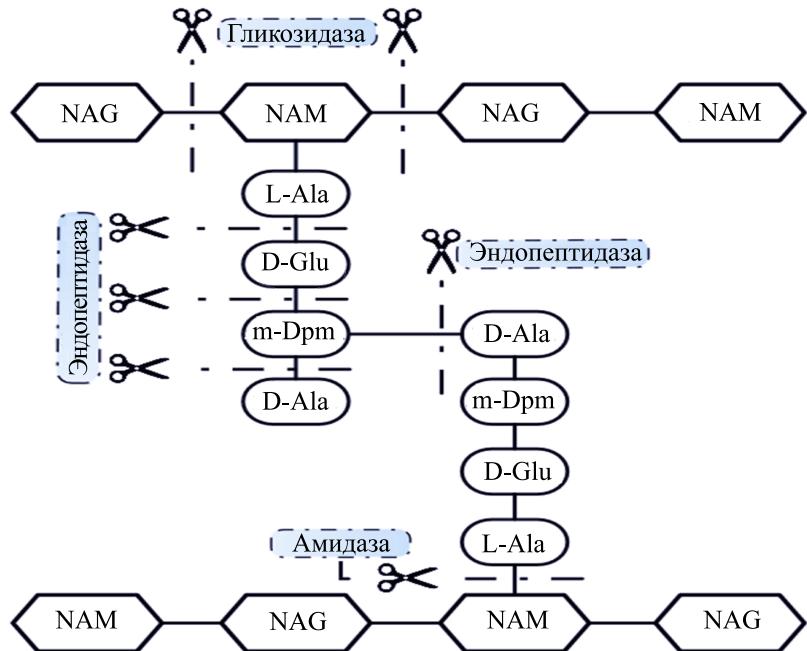


Рис. 1. Классификация эндолизинов по характеру разрушаемых связей. Используемые обозначения: NAG – N-ацетилглюкозамин, NAM – N-ацетилмуромовая кислота, L-Ala – L-аланин, D-Glu – D-глутамин, m-Dpm – мезодиаминопимелиновая кислота (ДАПК), D-Ala – D-аланин.

несколько EAD, принадлежащих к различным классам [7], что более характерно для бактериофагов с грамположительными клетками-хозяевами [8]. Тем не менее, существует предположение, что один из EAD в таком случае выполняет дополнительную функцию связывания пептидогликана [9].

Эндолизины, разрушающие пептидогликан грамположительных бактерий, являются многодоменными эндолизинами с EAD на N-конце и CBD на C-конце [10], в то время как эндолизины с грамотрицательными клетками-хозяевами чаще являются однодоменными ферментами, имеющими только единственный глобулярный EAD. Были обнаружены и многодоменные эндолизины, действующие на пептидогликан грамотрицательных бактерий, имеющие также один или несколько CBD, но в данном случае домены были соединены в противоположном порядке: CBD на N-конце и EAD на C-конце [11].

Более часто встречающаяся у грамположительных бактерий многодоменность эндолизинов объясняется отсутствием у грамположительных бактерий внешней мембранны. Более надежное связывание эндолизина с пептидогликаном и протеолиз эндолизинов с несколькими EAD протеазами клетки-хозяина приводит к затруднению лизиса клетки извне, предотвращая гибель колоний клеток в тех случаях, когда это не требуется для выхода потомства фага из клетки, что позво-

ляет бактериофагу эффективнее использовать ресурсы клеток-хозяев [12, 13].

Другими характеристиками, по которым различаются эндолизины бактериофагов грамотрицательных и грамположительных организмов, являются общий заряд ферmenta и его гидрофобность – оба параметра выше у грамотрицательных эндолизинов, что также затрудняет лизис грамположительных бактерий извне [14].

Несмотря на существование как однодоменных, так и многодоменных эндолизинов с изученной структурой и функциями, динамические особенности этих ферментов остаются малоизученными в связи со сложностью проведения экспериментов и интерпретации их результатов.

Изучение динамики свернутых белков позволяет связать структуру белков с их специфической функцией и коллективным поведением элементов структуры. Белки обычно характеризуются низкосимметричным локальным атомным окружением и плотной упаковкой, поэтому их динамика, как правило, анизотропна и коллективна. Теоретические исследования флуктуаций и коллективного движения элементов структур белков основаны либо на моделировании с применением молекулярной динамики (МД), либо на методе нормальных мод, также называемом анализом нормальных мод (АНМ) [15].

Структура молекулы белка, ее динамика и перенос энергии тесно связаны друг с другом.

Для белков характерен высокоанизотропный и селективный перенос энергии, который обеспечивает передачу сигналов между удаленными частями молекулы. Вычислительные исследования переноса возбуждений между частями белков показывают, что колебательная энергия распространяется субдиффузационно, аналогично переносу энергии на фрактальном объекте, таком как перколяционный кластер, для которого только относительно небольшое количество связанных путей пересекает объект и обеспечивает каналы для анизотропного потока. Соответствие белков объектам с фрактальной геометрией, а именно, трехмерным перколяционным кластерам, также подтверждается низкотемпературными исследованиями. Это позволяет эффективно использовать АНМ для установления динамических особенностей белков [16].

Анализ нормальных мод изучает движение объектов в потенциальной яме, с амплитудой, недостаточной для покидания потенциальной ямы. Вокруг стабильной конформации системы, которая представляет минимум поверхности потенциальной энергии, строится гармоническое приближение потенциальной ямы. Колебания по направлениям нормальных мод имеют четко определенную частоту, которая связана с кривизной потенциала вдоль направления движения. Таким образом, АНМ позволяет явно оценить все возможные частоты колебаний в системе, в том случае, если трением можно пренебречь.

В случае белка с N атомами существует $3N$ декартовых координат и, следовательно, также $3N$ направлений нормальных мод. $3N$ -мерный вектор в конфигурационном пространстве может представлять либо точку (конформацию белка) или направление (изменение конформации). Таким образом, вектор нормального мода описывает, в каком направлении движется каждый атом и насколько далеко он перемещается относительно других атомов. Математически векторы нормальных мод являются собственными векторами матрицы, описывающей форму потенциальной ямы. Соответствующие собственные значения описывают кривизну потенциала вдоль направлений нормальных мод [17].

При исследовании как непосредственно конформаций белков, так и изменений конформаций с использованием анализа нормальных мод наиболее информативной является ковариационная матрица, расчет которой требует использования всех мод [18]. В связи с этим все ковариационные матрицы, представленные в данном исследовании, включают полный набор полученных нормальных мод.

Целью данной работы является изучение динамических процессов, характерных для элементов структур однодоменного эндотицина

EndoT5 (клетка-хозяин соответствующего бактериофага — грамотрицательная бактерия *Escherichia coli*) и многодоменного эндотицина *PlyG* (клетка-хозяин соответствующего бактериофага — грамположительная бактерия *Bacillus anthracis*) для установления различий в подвижности элементов структуры эндотицинов, характерных для бактериофагов с грамотрицательными и грамположительными клетками-хозяевами. В частности, изучение динамических особенностей эндотицинов позволяет делать выводы о механизмах протекания различных процессов с участием этих ферментов: фолдинга, катализа, связывания с субстратом и поддержания катализитически активной конформации белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выбор структур. Для данного исследования были выбраны структуры эндотицинов бактериофагов, полученные методами ЯМР-спектроскопии и депонированные в базу данных Protein Data Bank с идентификаторами 2MXZ, 8P3A, 2L47 и 2L48. Эти структуры представляют собой Zn^{2+} -форму однодоменного эндотицина бактериофага T5 (*EndoT5-Zn²⁺*), Zn^{2+}/Ca^{2+} -форму однодоменного эндотицина бактериофага T5 (*EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺*) [19], EAD многодоменного эндотицина гамма-фага (*PlyG-EAD*) и CBD многодоменного эндотицина гамма-фага (*PlyG-CBD*) [20] соответственно.

Молекулярная динамика. Для каждой депонированной структуры в целях проведения дальнейшего исследования выбиралась первая модель, имеющая наименьшее значение целевой функции. Файлы топологии и файлы координат были получены из PDB-файлов, соответствующих структурам эндотицинов, с помощью программы tleap пакета программ AmberTools23 [21]. Молекулы растворялись в кубической ячейке, содержащей воду модели TIP3P, с линейным размером 10 Å и силовым полем ff14SB. Для нейтрализации полученных структур добавлялось требуемое количество ионов Cl^- .

Для каждой полученной структуры проводили эксперимент *in silico*, состоящий в изучении динамических процессов методом МД, с помощью программы sander пакета программ AmberTools23. Минимизация в течение 1000 шагов, при которой учитывалась только подвижность молекул воды, предшествовала минимизации в течение 1000 шагов, при которой учитывалась подвижность всей структуры. Далее система достигала равновесного состояния при постоянном объеме и 298.15 K в течение 5000 шагов с длительностью одного шага, составляющей 2 фс. Наконец, система достигала равновесного состояния при постоянном (атмосферном) давлении

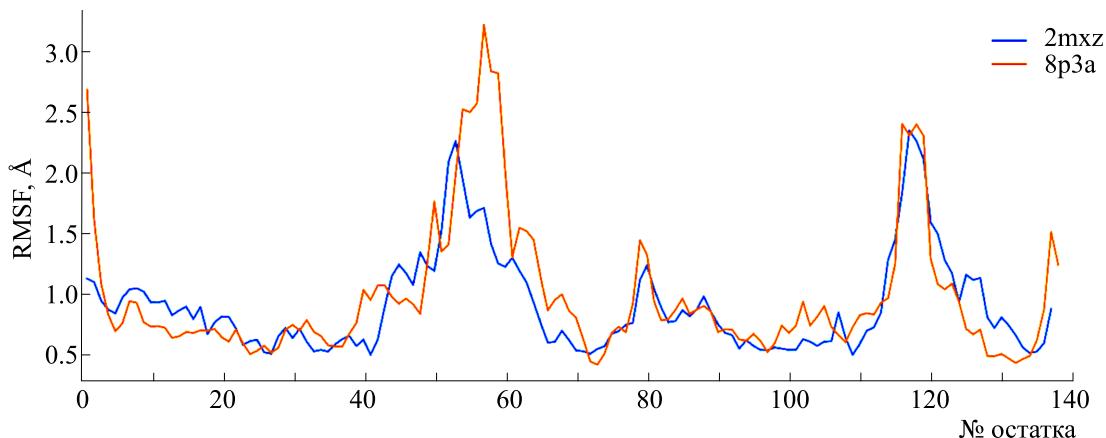


Рис. 2. RMSF согласно результатам проведения МД для остатков EndoT5–Zn²⁺ (2mxz) и EndoT5–Zn²⁺/Ca²⁺ (8p3a).

и 298.15 К в течение более 300 пс с длительностью одного шага, составляющей 1 фс.

Траектории движения атомов, полученные в результате процедур, описанных выше, были использованы для вычисления RMSF (усредненного по времени среднеквадратичного отклонения координат атомов), усредненного для атомов главной цепи (CO, CA и N^H), с помощью программы cprtraj пакета программ AmberTools23.

Анализ нормальных мод. Анализ нормальных мод, проведенный для структур, включающих полный набор атомов, был выполнен с помощью пакета Bio3d [22] языка R. При этом обрабатывались PDB-файлы, содержащие полный перечень депонированных моделей (в количестве 20 шт. для каждой структуры). Таким образом, для каждой структуры были вычислены RMSF и динамические матрицы кросс-корреляций.

Также для каждой депонированной структуры выбиралась первая модель, имеющая наименьшее значение целевой функции. Методом анали-

за нормальных мод для таких моделей на основе динамических матриц кросс-корреляции были получены кросс-корреляции смещений атомов.

Визуализация. Графики RMSF, полученные в результате МД, были визуализированы с помощью пакета matplotlib языка Python. Для визуализации структур использовалась система визуализации молекул PyMOL.

РЕЗУЛЬТАТЫ

RMSF, рассчитанные по траекториям движения атомов, полученным в результате выполнения МД, приведены на рис. 2 и 3.

RMSF, рассчитанные с применением АНМ, приведены на рис. 4 и 5.

Можно установить, что для EndoT5 наибольшая подвижность наблюдается в областях расположения петель, образованных остатками 40–70 и 111–132, а для PlyG подвижность выражена только в области расположения линкера,

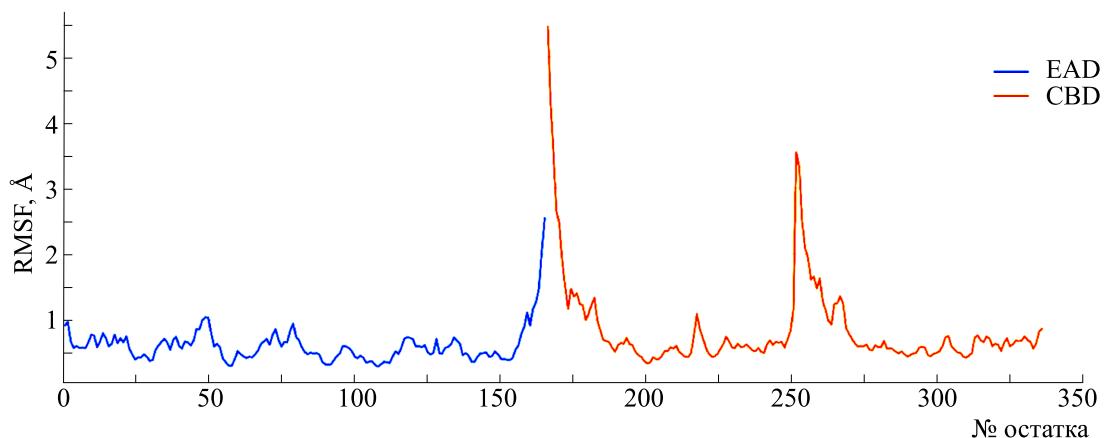


Рис. 3. RMSF согласно результатам проведения МД для остатков PlyG–EAD (EAD) и PlyG–CBD (CBD).

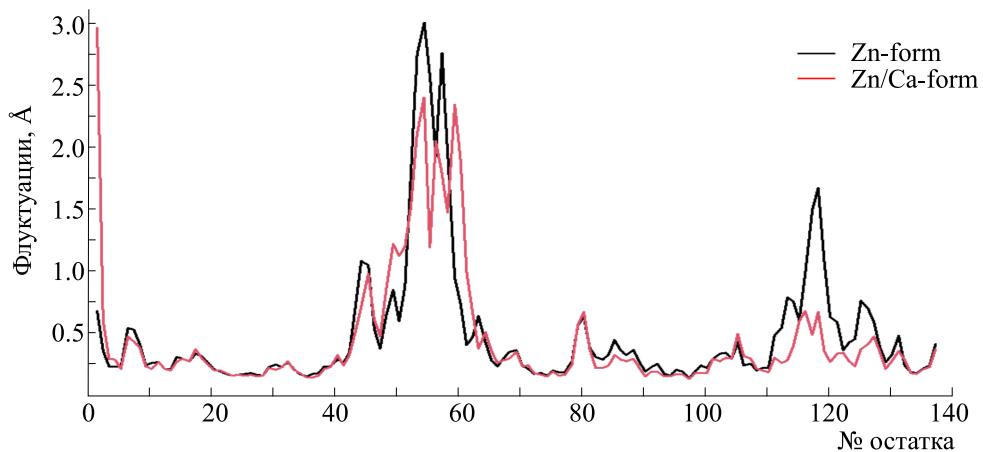


Рис. 4. RMSF согласно результатам проведения АНМ для остатков EndoT5–Zn²⁺ (Zn-form) и EndoT5–Zn²⁺/Ca²⁺ (Zn/Ca-form).

связывающего два домена. Наличие второго пика на рис. 3 и 5, соответствующего подвижности PlyG–CBD в области аминокислотного остатка 250, объясняется тем, что депонированная структура PlyG–CBD представляет собой димер субстрат-связывающего домена.

Динамические матрицы кросс-корреляции приведены на рис. 6 и 7. Кросс-корреляции смещений атомов, полученные на основе динамических матриц кросс-корреляции, приведены на рис. 8 и 9.

Распределение коэффициентов корреляции для четырех исследованных структур, полученное на основе анализа значений, входящих в соответствующие динамические матрицы кросс-корреляции, изображено в виде скрипичной диаграммы на рис. 10.

Пользуясь диаграммой, представленной на рис. 10, можно установить, что коррелированное

движение не связанных участков полипептидной цепи PlyG–EAD менее выражено, а его распределение коэффициентов кросс-корреляции характеризуется меньшей шириной, чем у трех других исследованных белковых структур.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существующее исследование [23], включающее экспериментальное изучение подвижности участков цепи EndoT5 методами ЯМР-спектроскопии, подчеркивает симбатный характер упорядочения конформационных состояний петель 40–70 и 111–132. Согласно работе [23], кальциевая активация EndoT5 включает формирование и стабилизацию каталитически активной «открытой» конформации активного центра, которая, как считается, характеризуется экспозицией гидрофобных аминокислот, участвующих во взаимодействии с субстратом.

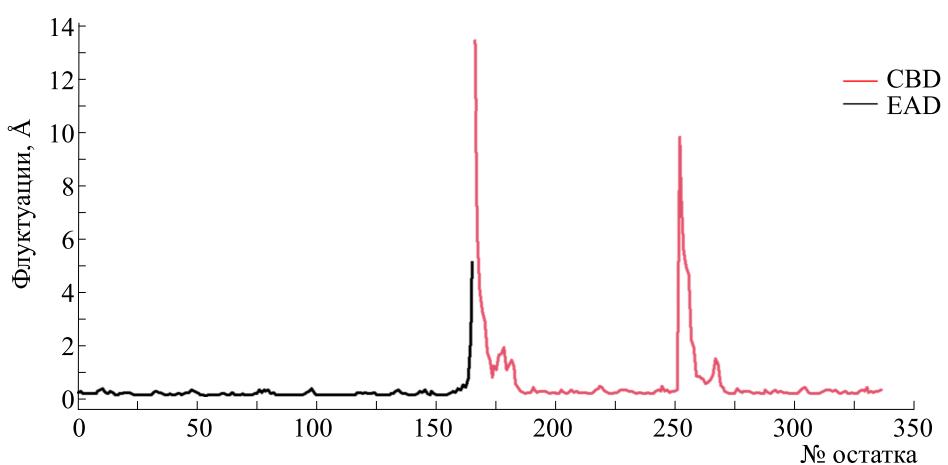


Рис. 5. RMSF согласно результатам проведения АНМ для остатков PlyG–EAD (EAD) и PlyG–CBD (CBD).

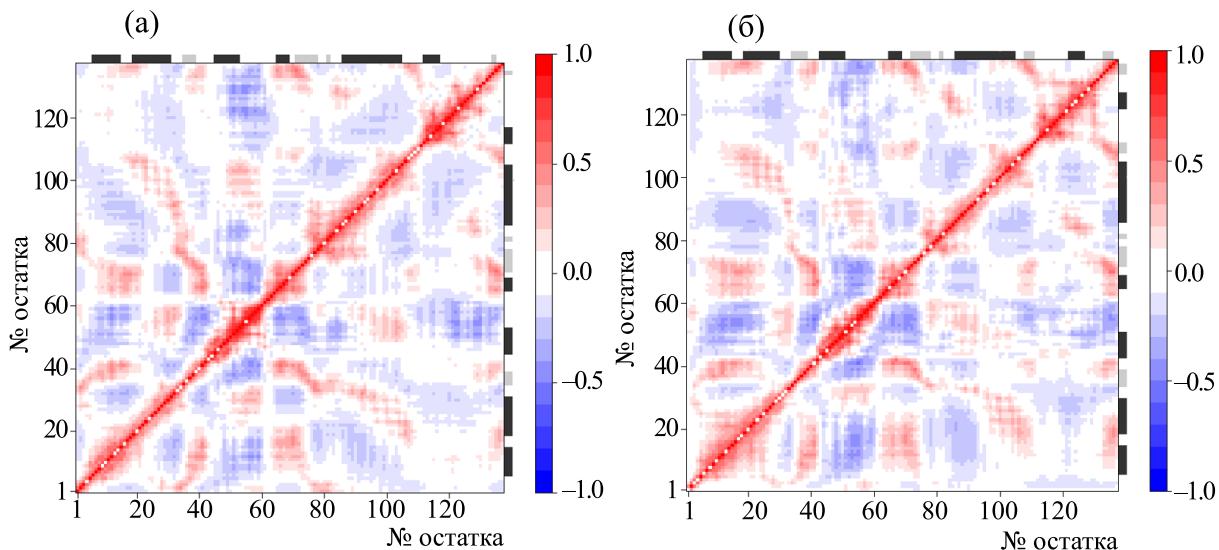


Рис. 6. Динамическая матрица кросс-корреляции для EndoT5–Zn²⁺ (а) и EndoT5–Zn²⁺/Ca²⁺ (б).

Результаты анализа подвижности участков цепи EndoT5, полученные в данном исследовании методами МД и АНМ, согласуются как между собой, так и с экспериментальными данными. Аналогично, можно установить, что в результате активации кальцием преобладает каталитически активная «открытая» конформация EndoT5. Тем не менее, благодаря полученным данным о кросс-корреляции смещений атомов, можно привести более детальное объяснение, основанное на изучении структуры белка. На рис. 8 показано, что цинковая форма EndoT5 способна к «ножницеобразному» движению петель 40–70 и 111–132, при этом концы петель движутся как от-

дельные жесткие тела. Амплитуда этого движения, согласно рис. 4, в наносекундном и субнаносекундном диапазоне превышает амплитуду движения, доступную для петель 40–70 и 111–132 цинк-кальциевой формы EndoT5, которая, между тем, способна к движению петли 40–70 «вверх–вниз» при малоподвижности петли 111–132, что обеспечивает вышеупомянутое преобладание каталитически активной «открытой» конформации EndoT5. Фиксация петли 111–132 и изменение характера движения петли 40–70 приводят к тому, что активный центр белка более «доступен» для взаимодействия с пептидогликаном.

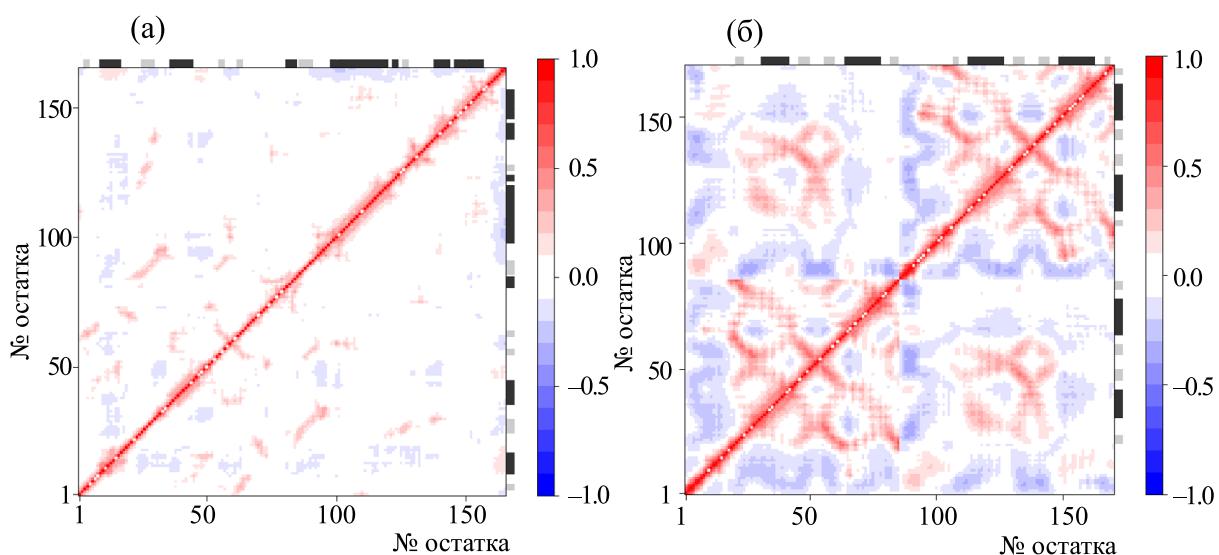


Рис. 7. Динамическая матрица кросс-корреляции для PlyG–EAD (а) и PlyG–CBD (б).

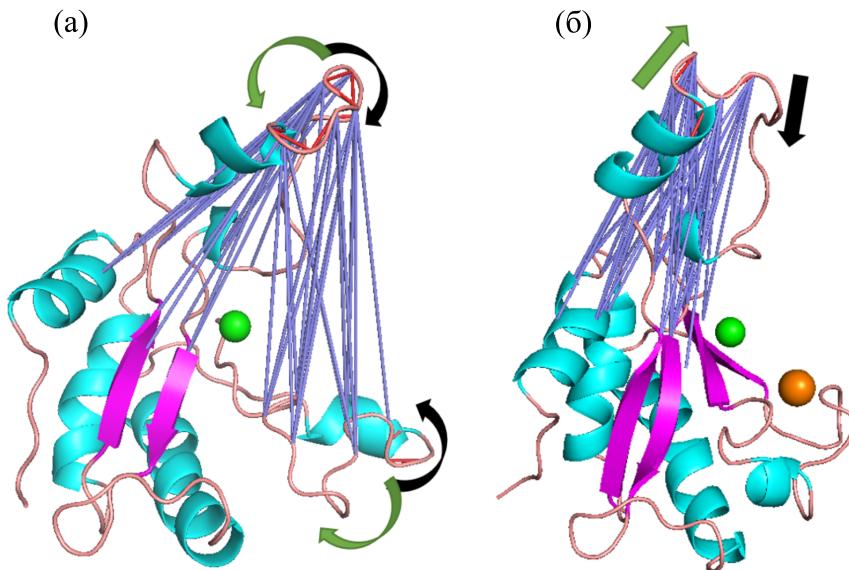


Рис. 8. Кросс-корреляции смещений атомов для EndoT5–Zn²⁺ (а) и EndoT5–Zn²⁺/Ca²⁺ (б). Ионы Zn²⁺ обозначены зелеными сферами, ионы Ca²⁺ обозначены оранжевыми сферами. Красные линии соединяют атомы основной цепи с положительным коэффициентом корреляции, составляющим [0.8; 1.0], а синие линии соединяют атомы основной цепи с отрицательным коэффициентом корреляции, составляющим [-0.6; -0.4]. Черные стрелки указывают направление движения, в результате которого петли, образованные аминокислотными остатками 40–70 и 111–132, сближаются; зеленые стрелки указывают направление движения, в результате которого они отдаляются друг от друга.

Движение петли 40–70 «вверх–вниз» также происходит быстрее, чем «ножницеобразное» движение петель 40–70 и 111–132, что подтверждается результатами МД (рис. 2): в субпикосекундном диапазоне цинк–кальциевая форма EndoT5 имеет более гибкую петлю 40–70 с петлей 111–132, сравнимой по гибкости с цинковой формой EndoT5. Это также объясняет увеличение вероятности катализа, так как приобретение молекулой активной конформации ускоряется.

Наконец, коррелированное движение не связанных участков цепи однодоменного EndoT5 более выражено, чем коррелированное движение не связанных регионов каталитического домена PlyG–EAD многодоменного PlyG. Это можно объяснить тем, что PlyG–EAD и PlyG–CBD зафиксированы в активной конформации, в то время как общая гибкость структуры белка, позволяющая реализовать механизмы связывания с субстратом (с помощью PlyG–CBD) и катализа

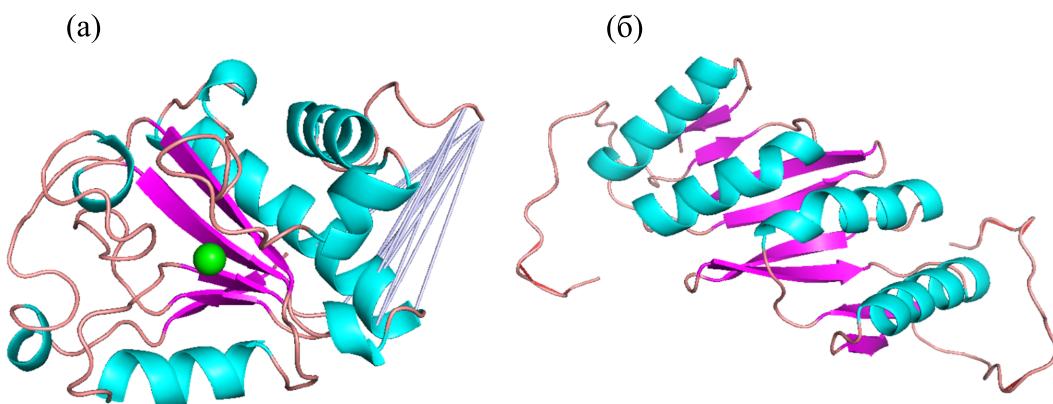


Рис. 9. Кросс-корреляции смещений атомов для PlyG–EAD (а) и PlyG–CBD (б). Ионы Zn²⁺ обозначены зелеными сферами. Красные линии соединяют атомы основной цепи с положительным коэффициентом корреляции, составляющим [0.8; 1.0], а синие линии соединяют атомы основной цепи с отрицательным коэффициентом корреляции, составляющим [-0.4; -0.2].

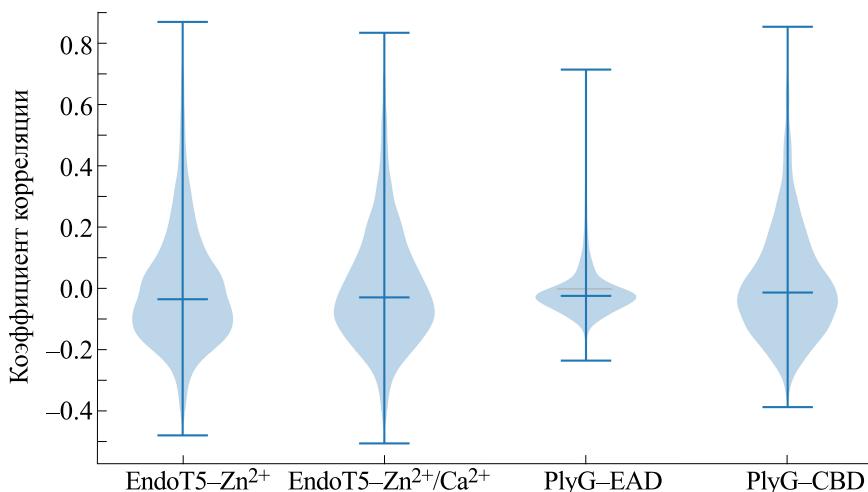


Рис. 10. Скрипичная диаграмма, соответствующая распределению коэффициентов кросс-корреляции EndoT5-Zn²⁺, EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺, PlyG-EAD и PlyG-CBD.

(с помощью PlyG-EAD) обеспечивается, в основном, наличием гибкого линкера, соединяющего EAD и CBD.

Можно предположить, что фундаментальным различием между однодоменными эндолизинами и EAD многодоменных эндолизинов является выраженная коррелированность движения несвязанных участков полипептидной цепи.

ВЫВОДЫ

Обнаружено, что активация EndoT5 ионом кальция приводит к преобладанию каталитически активной «открытой» конформации в результате изменения «ножницеобразного» характера взаимного движения петель 40–70 и 111–132 на движение петли 40–70 «вверх–вниз» над зафиксированной петлей 111–132. Участки аминокислотной цепи, характеризующиеся наибольшей подвижностью, обнаруженные в результате проведенных экспериментов *in silico*, совпали с участками аминокислотной цепи, характеризующими наибольшей подвижностью, обнаруженными с использованием методов ЯМР-спектроскопии.

Также установлено, что многодоменный эндолизин PlyG представляет собой два домена, зафиксированных в активной конформации, причем подвижность данной структуры обеспечивается в основном подвижной петлей, соединяющей два домена, а каталитически активный домен PlyG-EAD характеризуется менее выраженной корреляцией движений несвязанных участков аминокислотной цепи, чем однодоменный EndoT5. Обнаруженные различия могут являться фундаментальными для однодоменных и многодоменных эндолизинов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы подтверждают вклад в данное исследование согласно следующему перечню: концепция и план исследования – Аракелян А.Г., Чуев Г.Н.; сбор экспериментальных данных – Аракелян А.Г., Мамедов Т.В.; анализ и интерпретация результатов – Аракелян А.Г., Чуев Г.Н.; работа с литературными источниками – Мамедов Т.В., Ариков А., Исмаилов К.Р.; черновик рукописи – Аракелян А.Г., Ариков А., Исмаилов К.Р. Все авторы ознакомлены с результатами исследования и окончательной версией рукописи; авторы не имеют претензий к интерпретации данных и оформлению работы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00223-25-02.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Love M. J., Bhandari D., Dobson R. C. J., and Billington C. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and

- clinical care. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **7** (1), 17 (2018). DOI: 10.3390/antibiotics7010017
2. Fischetti V. A. Development of phage lysins as novel therapeutics: A historical perspective. *Viruses*, **10** (6), 310 (2018). DOI: 10.3390/v10060310
 3. Czaplewski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V. A., Foster S., Gilmore B. F., Hancock R. E., Harper D., Henderson I. R., Hilpert K., Jones B. V., Kadioglu A., Knowles D., Ólafsdóttir S., Payne D., Projan S., Shaunak S., Silverman J., Thomas C. M., Trust T. J., Warn P., and Rex J. H. Alternatives to antibiotics – a pipeline portfolio review. *Lancet. Infectious Diseases*, **16** (2), 239–251 (2016). DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00466-1
 4. Vermassen A., Leroy S., Talon R., Provot C., Popowska M., and Desvaux M. Cell wall hydrolases in bacteria: Insight on the diversity of cell wall amidases, glycosidases and peptidases toward peptidoglycan. *Front. Microbiol.*, **10**, 331 (2019). DOI: 10.3389/fmicb.2019.00331
 5. Wang M., Zhang J., Wei J., Jiang L., Jiang L., Sun Y., Zeng Z., and Wang Z. Phage-inspired strategies to combat antibacterial resistance. *Crit. Rev. Microbial.*, **50** (2), 196–211 (2024). DOI: 10.1080/1040841X.2023.2181056
 6. Low L. Y., Yang C., Perego M., Osterman A., and Liddington R. Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins. *J. Biol. Chem.*, **286** (39), 34391–34403 (2011). DOI: 10.1074/jbc.M111.244160
 7. Payne K. M. and Hatfull G. F. Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities. *PLoS One*, **7** (3), e34052 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0034052
 8. Oliveira H., Melo L. D., Santos S. B., Nóbrega F. L., Ferreira E. C., Cerca N., Azeredo J., and Kluskens L. D. Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins. *J. Virol.*, **87** (8), 4558–4570 (2013). DOI: 10.1128/JVI.03277-12
 9. Son B., Kong M., and Ryu S. The auxiliary role of the amidase domain in cell wall binding and exolytic activity of staphylococcal phage endolysins. *Viruses*, **10** (6), 284 (2018). DOI: 10.3390/v10060284
 10. Khan F. M., Chen J. H., Zhang R., and Liu B. A comprehensive review of the applications of bacteriophage-derived endolysins for foodborne bacterial pathogens and food safety: recent advances, challenges, and future perspective. *Front. Microbiol.*, **14**, 1259210 (2023). DOI: 10.3389/fmicb.2023.1259210
 11. Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C. W., Hertveldt K., and Lavigne R. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Mol. Microbiol.*, **65** (5), 1334–1344 (2007). DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05870.x
 12. Loessner M. J., Kramer K., Ebel F., and Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.*, **44** (2), 335–349 (2002). DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x
 13. Oechslin F., Menzi C., Moreillon P., and Resch G. The multidomain architecture of a bacteriophage endolysin enables intramolecular synergism and regulation of bacterial lysis. *J. Biol. Chem.*, **296**, 100639 (2021). DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100639
 14. Vázquez R., García E., and García P. Sequence-function relationships in phage-encoded bacterial cell wall lytic enzymes and their implications for phage-derived product design. *J. Virol.*, **95** (14), e0032121 (2021). DOI: 10.1128/JVI.00321-21
 15. Atilgan C., Okan O. B., and Atilgan A. R. How orientational order governs collectivity of folded proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **78** (16), 3363–3375 (2010). DOI: 10.1002/prot.22843
 16. Leitner M. D. Frequency-resolved communication maps for proteins and other nanoscale materials. *J. Chem. Phys.*, **130** (19), 195101 (2009). DOI: 10.1063/1.3130149
 17. Cui Q. and Bahar I. *Normal Mode Analysis: Theory and Applications to Biological and Chemical Systems*, 1st ed. (Chapman and Hall/CRC, 2005). DOI: 10.1201/9781420035070
 18. Van Wynsberghe A. W. and Cui Q. Interpreting correlated motions using normal mode analysis. *Structure*, **14** (11), 1647–1653 (2006). DOI: 10.1016/j.str.2006.09.003
 19. Mikoulinskaia G. V., Odinokova I. V., Zimin A. A., Lysanskaya V. Y., Feofanov S. A., and Stepnaya O. A. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. *FEBS J.*, **276** (24), 7329–7342 (2009). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07443.x
 20. Schuch R., Nelson D., and Fischetti V. A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, **418** (6900), 884–889 (2002). DOI: 10.1038/nature01026
 21. Case D. A., Aktulga H. M., Belfon K., Cerutti D. S., Cisneros G. A., Cruzeiro V. W. D., Forouzesh N., Giese T. J., Götz A. W., Gohlke H., Izadi S., Kasavajhala K., Kaymak M. C., King E., Kurtzman T., Lee T.-S., Li P., Liu J., Luchko T., Luo R., Manathunga M., Machado M. R., Nguyen H. M., O’Hearn K. A., Onufriev A. V., Pan F., Pantano S., Qi R., Rahnamoun A., Risheh A., Schott-Verdugo S., Shajan A., Swails J., Wang J., Wei H., Wu X., Wu Y., Zhang Sh., Zhao Sh., Zhu Q., Cheatham III Th. E., Roe D. R., Roitberg A., Simmerling C., York D. M., Nagan M. C., and Merz K. M. Jr. AmberTools. *J. Chem. Inf. Model.*, **63** (20), 6183–6191 (2023). DOI: 10.1021/acs.jcim.3c01153
 22. Grant B. J., Rodrigues A. P., ElSawy K. M., McCammon J. A., and Caves L. S. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics*, **22** (21), 2695–2696 (2006). DOI: 10.1093/bioinformatics/btl461
 23. Prokhorov D., Mikoulinskaia G., Kutyshenko V., and Uversky V. Structural basis of activation of zinc-dependent peptidase of the bacteriophage T5 by calcium ions: A glance at the ion-dependent functioning proteoforms. *Preprints*, 2024072561 (2024). DOI: 10.20944/preprints202407.2561.v1

Endolysins T5 and PlyG Dynamics: Comparative Analysis *in silico***A.G. Arakelian*, G.N. Chuev*, T.V. Mamedov*, A. Arikov**, and K.R. Ismailov*****

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***The Agricultural University of Plovdiv, Mendeleev blvd., 12, Plovdiv, 4000 Bulgaria*

****Olympic Reserve Sports School of Wrestling, Bolshaya Nizhegorodskaya ul. 43, Vladimir, Vladimir Region, 600020 Russia*

Bacteriophage endolysins are part of a lytic enzymes complex responsible for the destruction of the bacterial cell wall peptidoglycan. In this paper, the dynamic properties of bacteriophage T5 single-domain endolysin and the multi-domain endolysin PlyG of gamma phage are studied using molecular dynamics and normal mode analysis. The mechanism of activation of bacteriophage T5 endolysin by calcium and the discovery of a fundamental difference in the dynamic features of single-domain and multi-domain endolysins are explained.

Keywords: *endolysin, molecular dynamics, normal mode analysis, calcium activation, dynamic properties of proteins*