

На правах рукописи

Аракелян Арина Гагиковна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ RB49 И T5**

1.5.2. Биофизика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Пушино – 2025

Работа выполнена в лаборатории ЯМР-исследований биосистема Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), г. Пущино

Научный руководитель	- Чуев Геннадий Николаевич доктор физико-математических наук, гл. н.с. Лаборатории биофизики возбудимых сред ИТЭБ РАН
Официальные оппоненты	
Ведущая организация	

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 г. в __ часов на заседании совета 24.1.127.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по научной специальности 1.5.2. Биофизика на базе ИТЭБ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, городской округ Серпухов, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, городской округ Серпухов, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://web.iteb.psn.ru/news.htm>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

кандидат физико-математических наук

Н.Ф.Ланина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Устойчивость бактерий к антибиотикам является критической глобальной проблемой здравоохранения. Согласно прогнозу, основанному на систематическом анализе устойчивости к противомикробным препаратам, с 2025 по 2050 год антибиотикорезистентность станет причиной приблизительно 39 миллионов смертей. Развитие антибиотикорезистентности обусловлено чрезмерным и неправильным использованием антибиотиков, предназначенных для лечения людей, животных и нужд сельского хозяйства, а также недостаточными мерами профилактики и контроля инфекций. Одним из возможных решений данной проблемы является использование эндолизинов и антибактериальных составов на их основе.

Эндолизины бактериофагов – одно- или многодоменные литические ферменты, обеспечивающие высвобождение потомства фага из клетки бактерии-хозяина путем разрушения пептидогликана, основного компонента клеточной стенки бактерий. Данный антибактериальный эффект позволяет применять эндолизины в биотехнологии, для обработки воды, кожи, поверхностей, инструментов и продовольственных товаров, в сельском хозяйстве, и, в частности, решает проблему устойчивости ряда патогенов к антибиотикам, так как бактерии не способны развивать резистентность к эндолизинам. Тем не менее, в настоящее время эндолизины остаются малоисследованной группой ферментов с зачастую неизученными структурой и функциями, что ограничивает возможности их применения в качестве антибактериальных средств.

Вышесказанное определяет необходимость поиска соответствующих условий функционирования эндолизинов. В свою очередь, это требует определения участков их структуры, необходимых для поддержания ими ферментативной активности и способности к связыванию пептидогликана, установления особенностей такого связывания. Остается также открытым вопрос о

существовании принципиальных различий между однодоменными эндолизинами и каталитически активными доменами многодоменных эндолизинов. Решению этих задач и посвящена настоящая диссертационная работа.

В качестве объектов исследования в данной работе были выбраны однодоменные эндолизины семейства M15_C, EndoRB49 с молекулярной массой 14.7 кДа и EndoT5 с молекулярной массой 15.3 кДа, а также многодоменный эндолизин PlyG с молекулярной массой 27 кДа.

Известно, что для семейства M15_C характерно присутствие мотивов (Asp-His) H-x₆-D и D-x₂-H, необходимых для связывания Zn²⁺ в активном центре фермента, а также наличие консервативного остатка триптофана, роль которого в поддержании структуры и функций данных эндолизинов не определена. Примечательно, что ряд эндолизинов, принадлежащих к семейству M15_C, имеет в своей структуре, помимо иона Zn²⁺, регуляторный ион Ca²⁺, координированный аминокислотными остатками кальций-связывающей петли. Например, в структуре EndoT5 присутствует регуляторный кальций, а в структуре EndoRB49 он отсутствует.

Вместе с тем, несмотря на актуальность обсуждаемой тематики, на сегодняшний день работы по изучению EndoRB49 и EndoT5 единичны. Так, в настоящее время не установлено, какие аминокислотные остатки отвечают за связывание EndoT5 с пептидогликаном, а сама способность данных структур к связыванию напрямую не подтверждена. Кроме того, гипотеза о кальциевой активации EndoT5 в результате экспозиции гидрофобных аминокислот, участвующих во взаимодействии с пептидогликаном, требует более детальной проверки, основанной на рассмотрении изменения характера движения аминокислотных остатков белковой цепи.

Многодоменный эндолизин PlyG, разрушающий пептидогликан клетки-хозяина *Bacillus anthracis*, состоит из двух доменов: каталитически активного домена Amidase_2 и субстрат-связывающего домена. Причем отдельный каталитический домен PlyG способен сохранять и каталитическую, и субстрат-связывающую функции. Несмотря на изучение термостабильности PlyG и

определение способности его субстрат-связывающего домена связываться с вторичными полисахаридами клеточной стенки клетки-хозяина, сайт связывания каталитического домена с пептидогликаном остается неустановленным, а подвижность аминокислотных остатков обоих доменов PlyG - неизученной.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является определение структурных особенностей однодоменных эндолизинов семейства M15_C, играющих ключевую роль в поддержании данными эндолизинами своих функций, а также установление принципиальных различий в структуре однодоменного EndoT5 и каталитического домена многодоменного PlyG.

Цель работы предопределила выбор методов исследования. Так как эндолизины RB49 и T5 представляют собой небольшие глобулярные белки с подвижными петлями, кристаллизация которых затруднена, для установления роли консервативного триптофана в поддержании каталитически активной структуры эндолизинов семейства M15_C использовалась ЯМР-спектроскопия. Ввиду наличия у EndoT5 и отдельных доменов PlyG депонированных трехмерных структур поиск потенциальных сайтов связывания и анализ подвижности боковых цепей аминокислотных остатков проводился в работе *in silico*, без применения дорогостоящих экспериментальных методов со сложными в интерпретации результатами, а именно, методом «слепого» докинга. Теоретические исследования флуктуаций и коллективного движения элементов структур белков выполнялись методами молекулярной динамики (МД) и анализа нормальных мод (АНМ) [28].

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Методом ^1H ЯМР-спектроскопии установить роль консервативного триптофана в поддержании структуры и функций эндолизинов семейства M15_C – эндолизина бактериофага RB49 и эндолизина бактериофага T5.

2. Определить *in silico* потенциально возможные механизмы связывания однодоменных эндолизинов с пептидогликаном методом «слепого докинга».
3. Изучить подвижность аминокислотных остатков EndoT5 методами МД и АНМ для установления структурных изменений, сопутствующих его кальциевой активации.
4. Изучить динамические и кросс-корреляционные различия в подвижности аминокислотных остатков однодоменных и многодоменных эндолизинов методом АНМ.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые обнаружены сайты связывания однодоменного эндолизина EndoT5 семейства M15_C и каталитического домена эндолизина PlyG с бактериальным пептидогликаном, и описаны различия в положении этих сайтов связывания в аминокислотной последовательности белков.

С помощью анализа подвижности аминокислотных остатков EndoT5, в данной работе были охарактеризованы структурные изменения, вызываемые кальциевой активацией данного эндолизина. Кроме того, были обнаружены принципиальные структурные различия между однодоменным эндолизином EndoT5 и каталитическим доменом многодоменного эндолизина PlyG.

Также в настоящей работе подтверждается роль консервативного триптофана в стабилизации гидрофобного ядра и активного центра пептидаз семейства M15_C.

Теоретическая и практическая значимость работы

Настоящая работа вносит вклад в установление структурных и динамических особенностей, необходимых ферментам с антибактериальным потенциалом для сохранения функциональной активности.

Кроме того, определение сайтов связывания глобулярных эндолизинов с пептидогликаном позволяет более детально изучить взаимодействие эндолизинов с оболочками бактериальных клеток, в то время как обнаружение принципиальных различий в структурных особенностях однодоменного EndoT5 и многодоменного PlyG является важным этапом определения условий поддержания активности ферментов. Это позволяет создать теоретическую основу для применения EndoT5, PlyG и препаратов на их основе в биотехнологии, сельском хозяйстве, при антибактериальной обработке различных объектов и поверхностей.

Методология и методы исследования

Методология включала в себя предварительный дизайн биомакромолекул, получение экспериментальных и теоретических данных, последующий анализ и обобщение полученных результатов. Для решения поставленных задач был использован ряд современных методов и подходов, соответствующих мировым стандартам проведения подобного рода исследований.

Для определения роли консервативного триптофана в поддержании каталитически активных форм EndoT5 и EndoRB49 на спектрометре AVANCE-III 600 с применением программного пакета TOPSPIN 2.1 регистрировались ¹H-спектры.

Сайты связывания EndoT5 и отдельных доменов PlyG определялись методом «слепого докинга» в программе Autodock Vina. Значения сродства белка к лиганду, полученные в результате проведения «слепого докинга», дополнительно подтверждались методом интегральных уравнений в приближении трехмерной модели взаимодействующих силовых центров (3D-RISM – Three-Dimensional Reference Interaction Site Model) из пакета программ AmberTools24

Расчеты усредненного по времени среднеквадратичного отклонения координат атомов (RMSF - Root Mean Square Fluctuation), усредненного для атомов главной цепи (CO, CA и NH), выполнялись методом МД в программе sander с

применением программы `srptraj` пакета программ AmberTools24. Анализ нормальных мод проводился с помощью пакета `Bio3d` языка R.

Визуализация результатов была реализована с помощью программного пакета `RyMOL`, пакета `Bio3d` языка R и пакета `matplotlib` языка Python.

Положения, выносимые на защиту

1. Установленная роль характерного для эндолизинов бактериофагов семейства M15_C консервативного остатка триптофана в поддержании каталитически активной конформации ферментов.

2. Обнаруженная способность однодоменного EndoT5 к N-концевому и полостному связыванию пептидогликана, а каталитического домена PlyG – к полостному связыванию пептидогликана.

3. Выявленная взаимосвязь между изменением характера взаимного движения петель 40-70 и 111-132 с «ножницеобразного» на движение петли 40-70 «вверх-вниз» над зафиксированной петлей 111-132, и преобладанием каталитически активной «открытой» конформации EndoT5 в результате кальциевой активации.

4. Выраженность коррелированного движения не связанных регионов и подвижность аминокислотных остатков каталитического домена PlyG-EAD многодоменного PlyG, однодоменного EndoT5 и субстрат-связывающего домена PlyG-CBD многодоменного PlyG.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методик исследований и обработки данных и принятых нормативных протоколов исследований, воспроизводимостью результатов экспериментов, а также согласованностью полученных результатов с имеющимися в мировой литературе. Результаты получены на современном научном оборудовании с

использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями, и в полном объеме опубликованы в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Scopus и Web of Science.

Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: на 26-й и 27-й Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2023, 2024), на конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пущино, 2023), на III Пущинской Школе-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (Пущино, 2023), на конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пущино, 2025).

Результаты данного исследования в полной мере отражены в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук по соответствующим отрасли и специальности, а также в тезисах 4-х докладов на Всероссийских конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Предварительная структура EndoRB49

В результате проведения ряда ^1H , ^{13}C , ^{15}N многомерных ЯМР-экспериментов (HSQC ^{15}N , HSQC ^{13}C , CBCAcoNH, HNCACB, HNCО, HNcaCO, HCcH, hCCH, (HB)CB(CGCD)HD, а также ^{15}N -TOCSY, ^{15}N -NOESY и ^{13}C -NOESY) на образцах ^{13}C – ^{15}N – меченой формы EndoRB49 с помощью программы CARA в рамках исследования [1] нами было выполнено отнесение более 90% сигналов ^1H , ^{13}C и ^{15}N . Предварительная пространственная структура, рассчитанная с помощью программы CYANA 2.1 и визуализированная с помощью программы MOLMOL, приведена на рисунке 1.

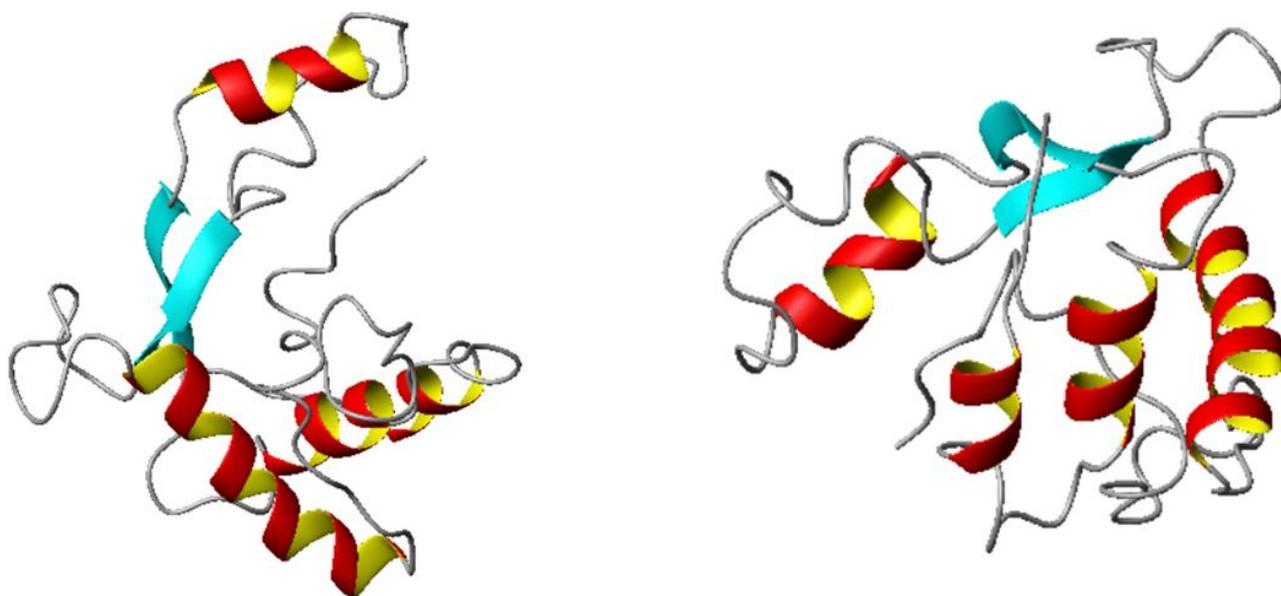


Рисунок 1 - Предварительная трехмерная структура EndoRB49. Воспроизведено из [1].

По результатам расчетов было установлено, что EndoRB49 имеет мотив укладки полипептидной цепи, характерный для семейства M15_C, и представляет

собой преимущественно альфа-спиральный белок, отдельные участки полипептидной цепи которого имеют вид бета-листов (рисунок 1).

Анализ совокупности полученных данных показал, что эксперимент (НВ)СВ(CGCD)HD, использованный нами для отнесения сигналов боковых цепей ароматических аминокислотных остатков Phe, Tyr и His, не был достаточным для однозначного отнесения сигналов данных остатков. Вследствие этого, была получена только предварительная структура EndoRB49. Получение его полноценной структуры требует проведения дополнительных экспериментов [1], обработка результатов которых продолжается в настоящее время.

2. Роль консервативного триптофана в поддержании структуры и функций EndoRB49 и EndoT5

Для эндолизинов семейства M15_C характерно наличие консервативного остатка триптофана, роль которого в поддержании структуры и функций данных эндолизинов не была определена ранее. Данный консервативный остаток входит в состав кальций-связывающей петли EndoT5, но его присутствие наблюдается и в структурах других эндолизинов этого семейства, не связывающих ион кальция, в частности, EndoRB49 и EndoRB43.

В рамках данной работы были проанализировали структурные изменения, вызванные мутациями по консервативному триптофану, отслеживаемые на ^1H ЯМР-спектрах. При этом, помимо ^1H ЯМР-спектров EndoT5 и EndoRB49, были получены ^1H ЯМР-спектры их фенилаланиновых (F) и аланиновых (A) точечных мутантов, EndoT5W114F, EndoT5W114A, EndoRB49W109F и EndoRB49W109A.

Участки ^1H ЯМР-спектров, полученные нами в работе [2] и содержащие сигналы некоторых атомов, входящих в состав гидрофобного ядра EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺, а также сигналы аналогичных атомов EndoT5W114F и EndoT5W114A, приведены на рисунке 2.

Согласно рисунку 2, у EndoT5W114F и EndoT5W114A, по сравнению с EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺, меняется положение высокопольного резонанса при -0.66 ppm,

соответствующего сигналу γ 1H Val93 (V93). Тем не менее, по нашим данным [2], изменения химического окружения аминокислотного остатка Val93 EndoT5 носят локальный характер: в частности, они не затрагивают другой аминокислотный остаток, также входящий в состав гидрофобного ядра EndoT5 и расположенный вблизи Val93, Leu28 (L28). Из рисунка 2 видно, что при замене консервативного триптофана EndoT5 на фенилаланин или аланин положение резонансной частоты δ 1H Leu28 при -0.683 ppm практически не меняется.

Таким образом, из анализа высокопольной части 1 H ЯМР-спектров мутантных форм EndoT5- Zn^{2+}/Ca^{2+} следует, что при замещении консервативного триптофана фенилаланином и аланином в гидрофобном ядре глобулярной молекулы наблюдаются вышеуказанные локальные структурные изменения.

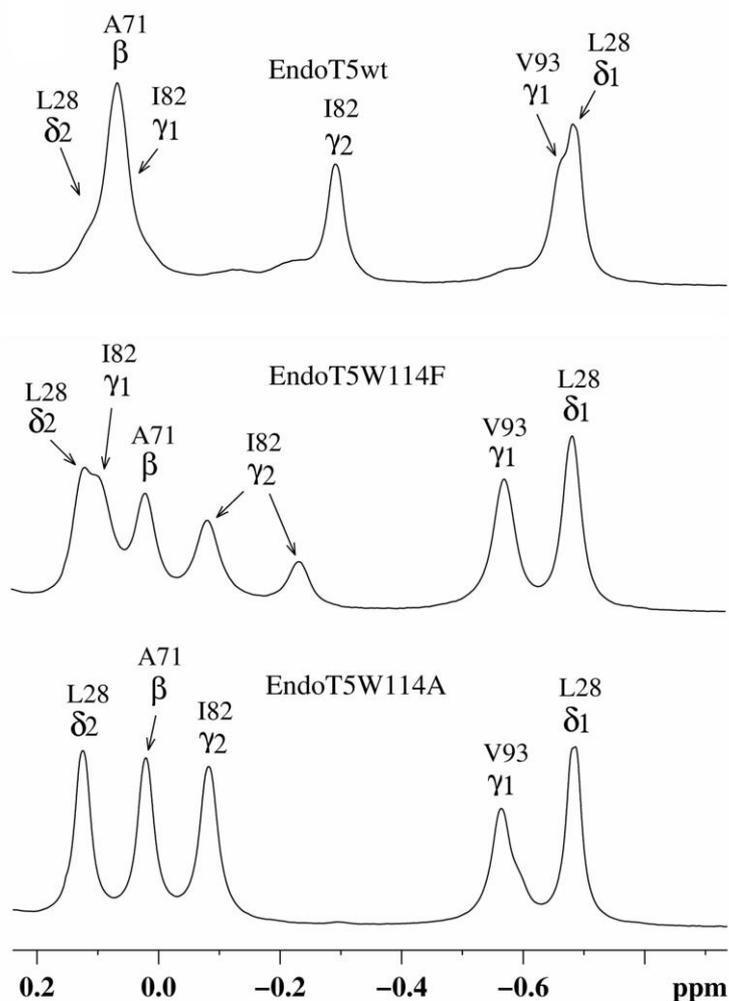


Рисунок 28 - Высокопольная часть 1 H ЯМР-спектров Zn^{2+} - Ca^{2+} EndoT5 и его мутантных форм. Воспроизведено из [2].

Кроме того, согласно рисунку 2, при замещении консервативного триптофана фенилаланином и аланином наблюдается снижение интенсивности высокопольного сигнала $\gamma^2\text{H}$ Le82 (I82) при -0.291 ppm [2], возникающего при формировании каталитически активной конформации EndoT5.

При этом потеря интенсивности сигнала $\gamma^2\text{H}$ Le82 при -0.291 ppm сопровождается его смещением в область низких полей к положению при -0.081 ppm (рисунок 2) [2]. Смещение сигнала $\gamma^2\text{H}$ Le82 на ^1H ЯМР-спектрах мутантных форм EndoT5 по сравнению с нативной формой белка с точки зрения изменений в трехмерной структуре EndoT5, вызванных точечными мутациями, можно объяснить изменением взаимного расположения боковых цепей Le82 и Trp84, затрагивающим, в том числе, пространственное положение кальций-связывающей петли относительно данных экспонированных остатков [2].

Участки ^1H ЯМР-спектров, полученные нами в работе [2] и содержащие сигналы некоторых атомов, входящих в состав гидрофобного ядра EndoRB49-Zn²⁺, а также сигналы аналогичных атомов EndoRB49W109F и EndoRB49W109A, приведены на рисунке 3. Согласно рисунку 3, у EndoRB49W109F и EndoRB49W109A, по сравнению с EndoRB49-Zn²⁺, меняется положение высокопольных резонансов от $\gamma^2\text{H}$ и $\delta^1\text{H}$ Le88 (I88) при 0.193 ppm и от βH Ala89 (A89) при -0.306 ppm.

Смещение положений высокопольных резонансов этих остатков вниз по полю (рисунок 3) в направлении положений сигналов аминокислотных остатков, не входящих в гидрофобное ядро белка, указывает на более выраженное экспонирование данных аминокислотных остатков. Так, аминокислотные остатки Le88 и Ala89, находящиеся в гидрофобном ядре нативного EndoRB49, являются более экспонированными у EndoRB49W109F и наиболее экспонированными, среди трех изученных форм белка, у EndoRB49W109A.

Таким образом, из анализа высокопольной части ^1H ЯМР-спектров EndoRB49 и его мутантных форм следует, что при замещении консервативного триптофана фенилаланином и аланином меняется структура гидрофобного ядра EndoRB49 [2].

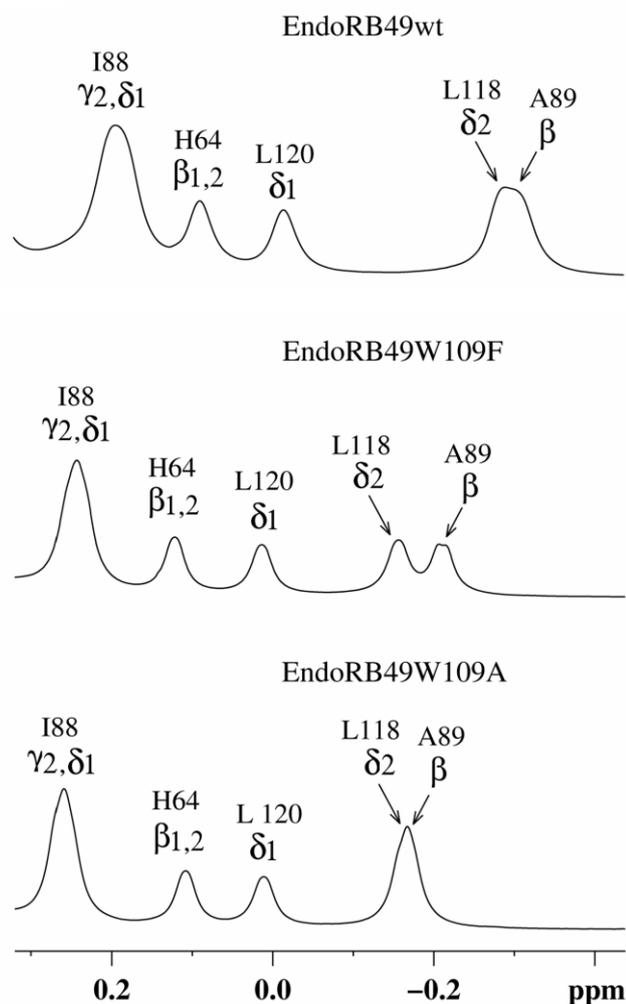


Рисунок 3 - Высокопольная часть ¹H ЯМР-спектров Zn²⁺ - EndoRB49 и его мутантных форм. Воспроизведено из [2].

Низкопольная часть ¹H ЯМР-спектров EndoT5, EndoT5W114F и EndoT5W114A, полученных нами в работе [2], приведена на рисунке 4. В ¹H ЯМР-спектрах мутантных форм EndoT5 происходит постепенное смещение положения резонанса ε₂HN His133 (H133) от его исходного положения при 15.70 ppm в область более высоких полей.

На рисунке 5 приведена низкопольная часть полученных нами в работе [2] ¹H ЯМР-спектров EndoRB49-Zn²⁺, EndoRB49W109F и EndoRB49W109A. Аналогично, в ¹H ЯМР-спектрах мутантных форм EndoRB49 происходит постепенное смещение положения резонанса ε₂HN His117 (H117) от его исходного положения при 14.11 ppm в область более высоких полей [2].

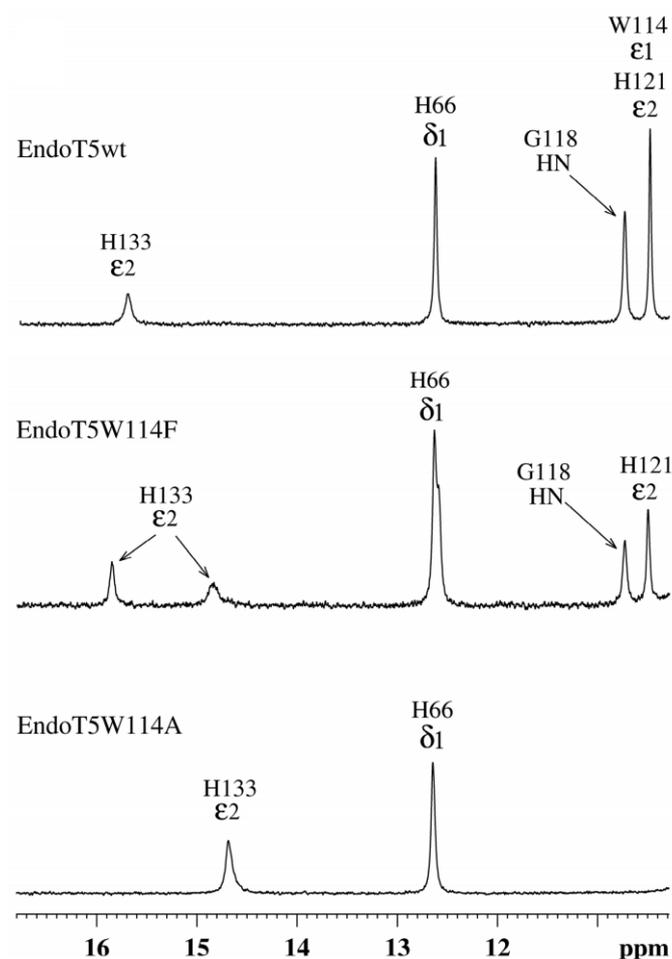


Рисунок 4 - Низкопольная часть ^1H ЯМР-спектров Zn^{2+} - Ca^{2+} EndoT5 и его мутантных форм. Воспроизведено из [2].

Следовательно, структурные изменения в активном центре точечных мутантов EndoT5 и EndoRB49, выражающиеся в изменениях химического окружения His133 и His117, соответственно, происходят совместно с описанными ранее структурными изменениями в гидрофобном ядре ферментов. Сдвиг резонансов $\epsilon 2\text{HN}$ гистидинов в активном центре EndoT5 и EndoRB49 может являться результатом изменения взаимной конфигурации остатков гистидина, формирующих активный центр белка и координирующих каталитический Zn^{2+} [2]. В таком случае замена консервативного Trp114 EndoT5 и Trp109 EndoRB49 на фенилаланин или аланин вызывает нарушение оптимального взаимного расположения цинк-координирующих аминокислотных остатков активного центра исследуемых металлопептидаз [2].

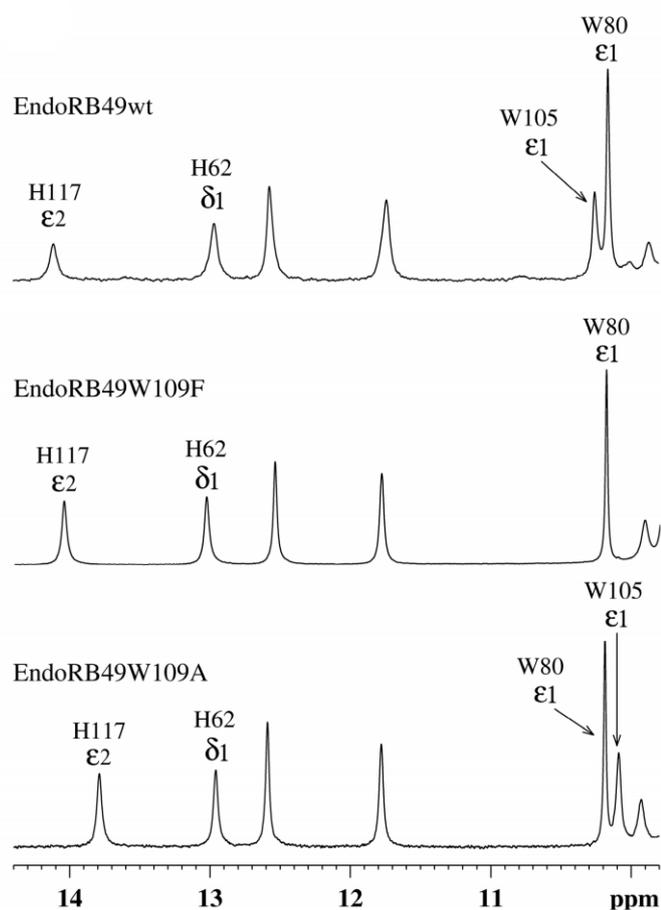


Рисунок 5 - Низкопольная часть ^1H ЯМР-спектров Zn^{2+} - EndoRB49 и его мутантных форм. Воспроизведено из [2].

Кроме того, при рассмотрении низкопольной части ^1H ЯМР-спектров EndoT5 и его мутантных форм (рисунок 4), можно наблюдать изменение интенсивности сигнала амидных протонов Gly118 (G118) и $\epsilon 2\text{HN}$ His121 (H121). Указанные аминокислотные остатки являются частью кальций-связывающей петли EndoT5. Предположительно, при замене аминокислотного остатка Trp114 на фенилаланин способность к связыванию кальция снижается, а связанный Ca^{2+} не приводит к надежной фиксации петли, снижая долю молекул в активной, «открытой» конформации [2].

Таким образом, несмотря на то что консервативный триптофан не входит в гидрофобное ядро или активный центр эндолизинов T5 и RB49, замена данного аминокислотного остатка на фенилаланин или аланин вызывает изменение структуры как гидрофобного ядра (экспонирование аминокислотного остатка

Val93 EndoT5 и аминокислотных остатков Ile88 и Ala89 EndoRB49), так и активного центра эндолизинов T5 и RB49 (Zn^{2+} -связывающих остатков His133 и His117, соответственно), а также приводит к изменениям в структуре кальций-связывающей петли EndoT5 (изменение химического окружения аминокислотных остатков Gly118 и His121) [2].

Была выдвинута гипотеза об участии консервативного триптофана в связывании эндолизинов семейства M15_C с пептидогликаном. Данная гипотеза была проверена в рамках настоящей работы методом молекулярного докинга.

3. Механизмы связывания пептидогликана эндолизинами

Четыре структуры, депонированные в Protein Data Bank (PDB ID 2MXZ, 8P3A, 2L47 и 2L48) полученные методом ЯМР-спектроскопии, Zn^{2+} форма EndoT5, Zn^{2+}/Ca^{2+} форма EndoT5, а также структуры отдельно изученных каталитически активного и субстрат-связывающего доменов многодоменного эндолизина PlyG соответственно, были выбраны в качестве структур белка, для которых изучалось связывание эндолизинов с бактериальным пептидогликаном *in silico*.

В качестве структур, представляющих пептидогликан, были выбраны трехмерные структуры фрагментов пептидогликана, типичные для различных видов бактерий, представленные в базах данных PubChem и Chemical Compounds Deep Profiling Services (CC-DPS): N-ацетилглюкозамин (NAG, PubChem CID 24139) (рис. 6A), N-ацетилмураминовая кислота (NAM, PubChem CID 5462244) (рис. 6B), димер NAG-NAM (PubChem CID 72210857) (рис. 6C), NAM-L-аланин (PubChem CID 10970945) (рис. 6D), NAM-L-аланил-D-изоглутамин (PubChem CID 451714) (рис. 6E), NAM-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (CC-DPS CT1103206303) (рис. 6F), мурамилпентапептид (CC-DPS CT1080279170) (рисунок 6G), мономер пептидогликана (CC-DPS CT1079218991) (рисунок 6H) и пентаглицин (PubChem CID 81537) (рисунок 6I). Структуры белков полагались жесткими. Конформационные углы в структурах лигандов были способны свободно меняться в рамках существующих стерических взаимодействий.

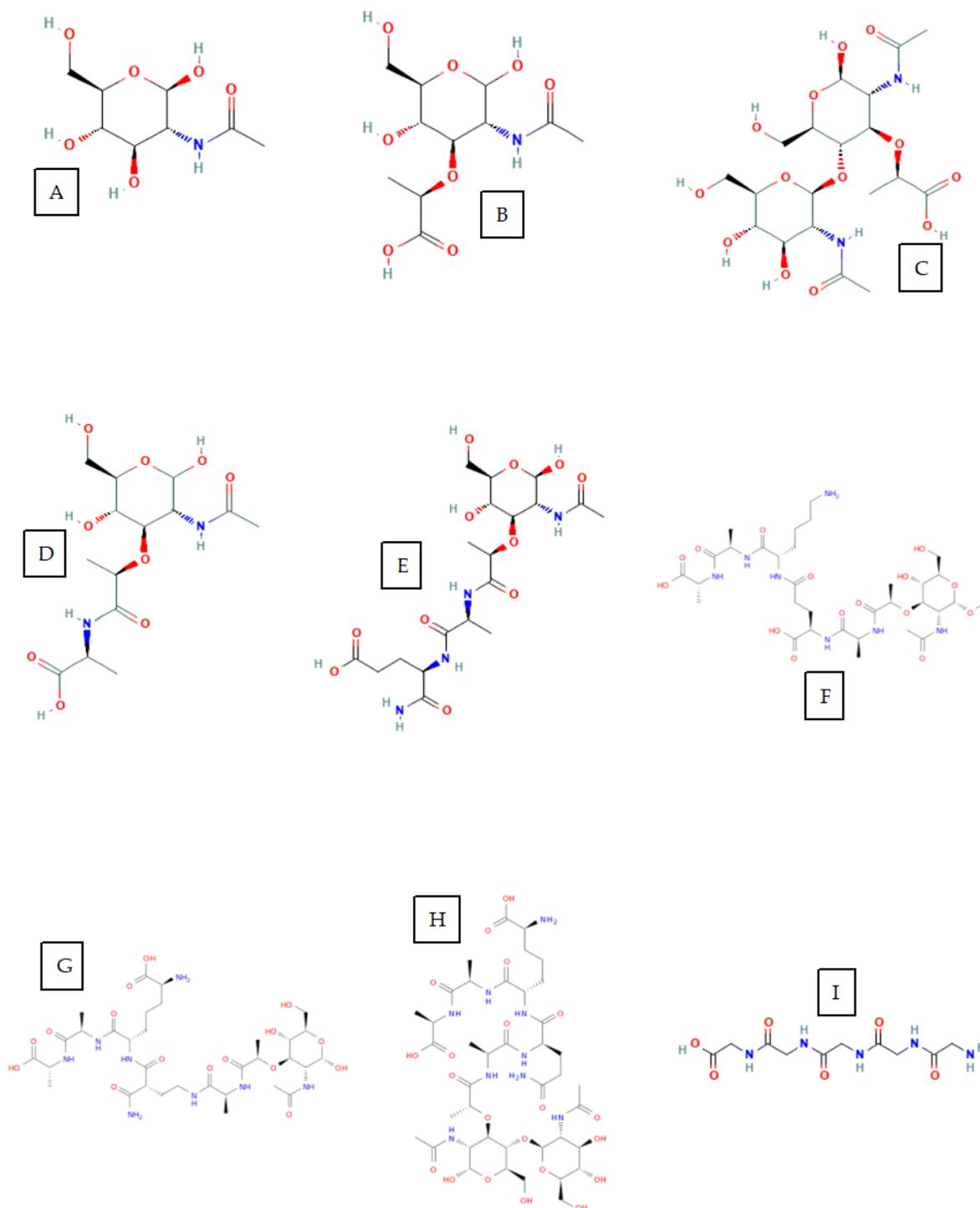


Рисунок 6. Структуры лигандов: NAG (A), NAM (Б), NAG-NAM (C), NAM-L-Ala (D), NAM-L-Ala-γ-D-Glu (E), CC-DPS CT1103206303 (F), CC-DPS CT1080279170 (G), CC-DPS CT1079218991 (H) и пентаглицин (I). Воспроизведено из работы [3].

Согласно молекулярному докингу, выполненному в Autodock Vina, у однодоменного EndoT5 существует два возможных сайта связывания пептидогликана. Первый возможный сайт связывания включает только N-конец

белка (рисунок 7), а второй сайт связывания, в дополнение к этому, включает часть α -спирали и подвижный линкер, образованный остатками Arg26 – Tyr33 (рисунок 8), таким образом помещая лиганд в «полость».

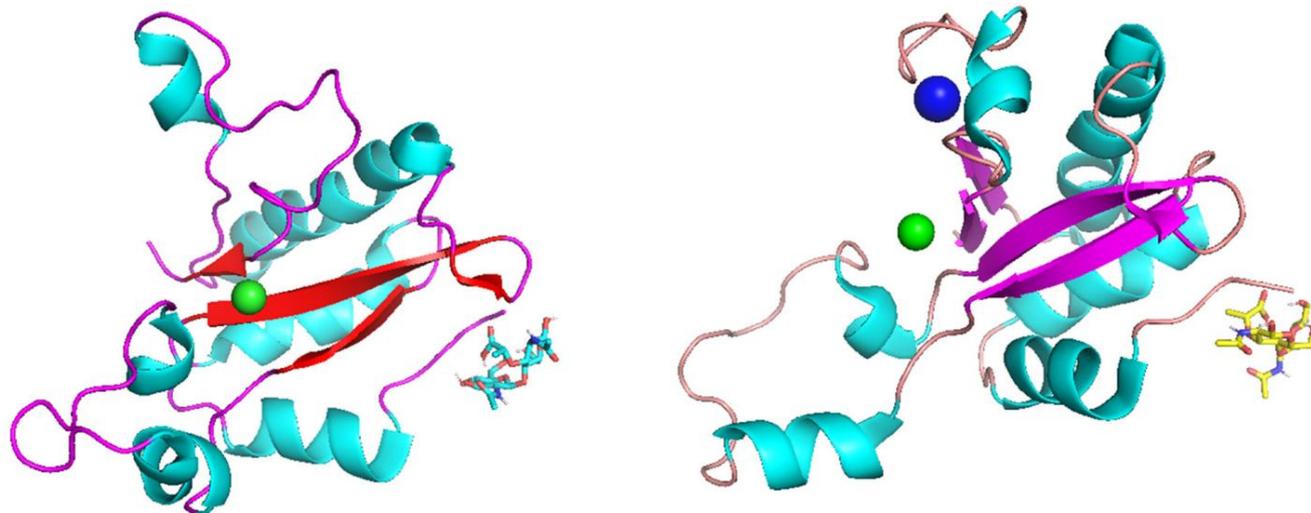


Рисунок 7 – N-концевое связывание эндолизина Endo T5-Zn²⁺ (слева) и эндолизина Endo T5-Zn²⁺/Ca²⁺ (справа) с лигандом NAG-NAM. Зеленые сферы обозначают ион Zn²⁺, синяя сфера – ион Ca²⁺ [3].

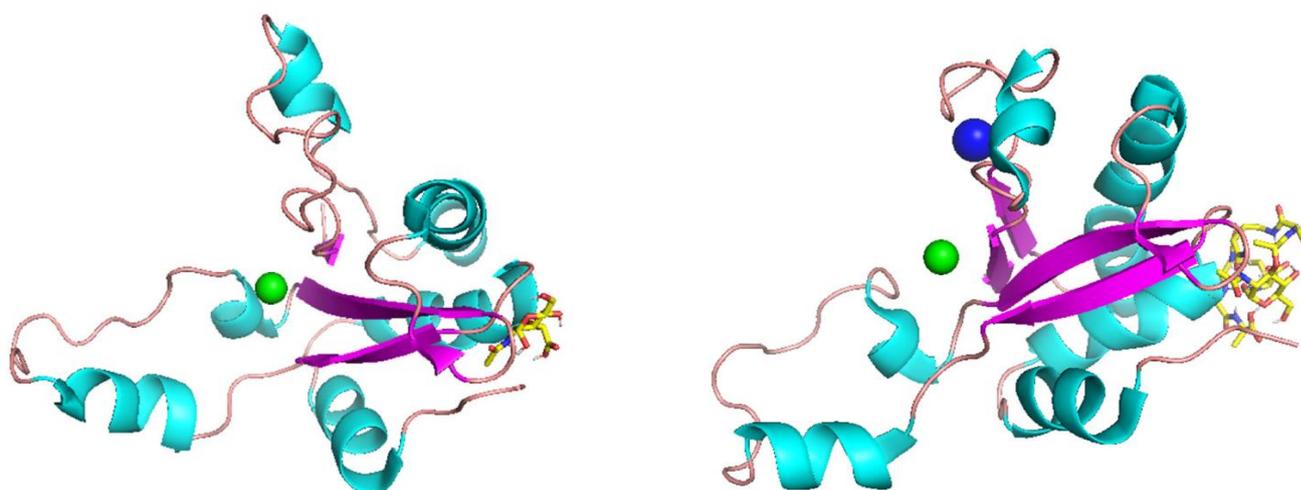


Рисунок 8 – «Полостное» связывание эндолизина Endo T5-Zn²⁺ с лигандом NAM (слева) и «полостное» связывание эндолизина Endo T5-Zn²⁺/Ca²⁺ с лигандом SS-DPS CT1103206303 (справа). Зеленые сферы обозначают ион Zn²⁺, синяя сфера – ион Ca²⁺ [3].

Для выбранного нами набора лигандов, при проведении молекулярного докинга наблюдалось N-концевое связывание EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺ и «полостное» связывание Endo T5-Zn²⁺ с NAM. При связывании EndoT5 с лигандом СТ1103206303 наблюдалось N-концевое связывание EndoT5-Zn²⁺ и «полостное» связывание EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺. При связывании с остальными фрагментами пептидогликана для EndoT5-Zn²⁺ и Endo T5-Zn²⁺/Ca²⁺ было характерно «полостное» связывание.

При этом для каталитически активного домена PlyG наблюдалось «полостное» связывание с мурамилпентапептидом СС-DPS СТ1080279170 (NAM – L – аланил – D – изоглутаминил – мезо – диаминопимелиновая кислота – D – аланил – D – аланин) (рисунок 9) [3].

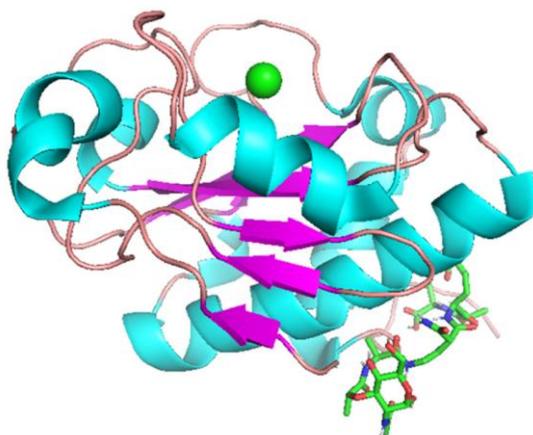


Рисунок 9 - «Полостное» связывание каталитически активного домена PlyG с мурамилпентапептидом. Зеленая сфера обозначает ион Zn²⁺ [3].

На рисунке 10 приведены примеры N-концевого (Endo T5-Zn²⁺/Ca²⁺, связанный с пептидогликановым мономером) и «полостного» механизмов связывания (Endo T5-Zn²⁺/Ca²⁺, связанный с СС-DPS СТ1103206303). N-концевое связывание, в основном, происходит за счет экспонированной в раствор ароматической боковой цепи аминокислотного остатка Phe3 и приводит к тому, что часть структуры пептидогликана, содержащая связь L-Ala-D-Glu, расщепляемую EndoT5, оказывается недоступной для эндолизина (рисунок 10, слева). При этом «полостное» связывание с участием боковых цепей Arg26 – Tyr33 приводит к

сохранению возможности расщепления EndoT5 связи L-Ala-D-Glu (рисунок 10, справа). В результате «полостного» связывания доступ к связи L-Ala-D-Glu, разрушаемой EndoT5, не оказывается закрытым другими участками бактериального пептидогликана, в отличие от наблюдающегося при N-концевом связывании попадания связи L-Ala-D-Glu внутрь структуры пептидогликана [3].

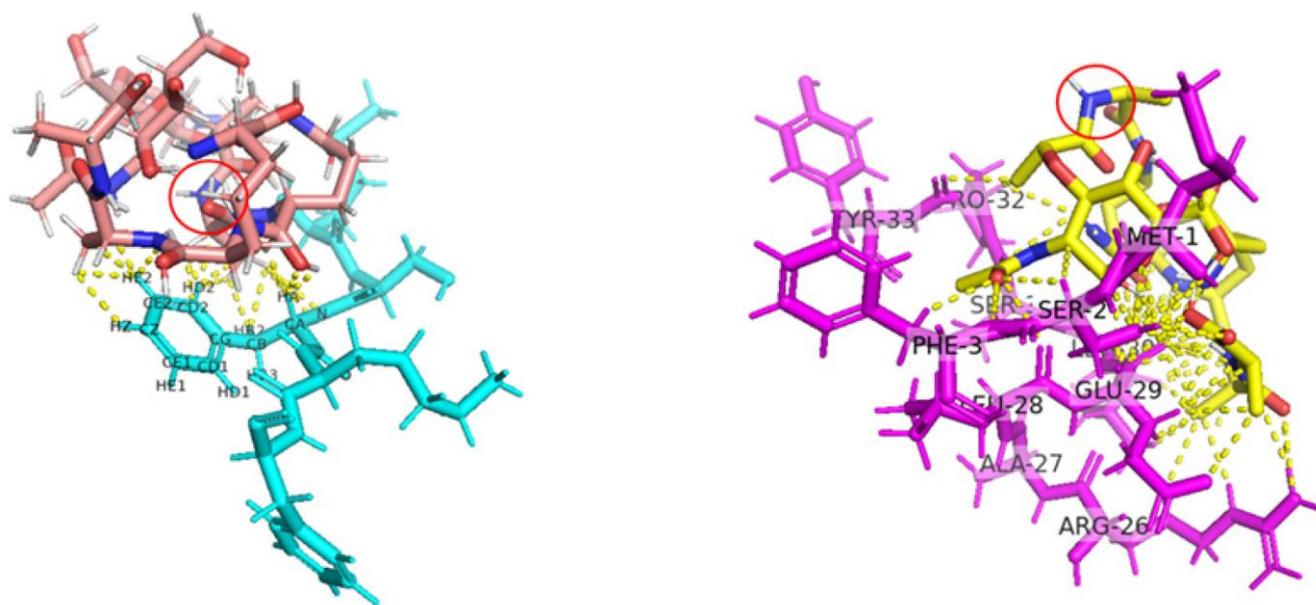


Рисунок 10 - Endo T5-Zn²⁺/Ca²⁺, связывающий пептидогликановый мономер (слева) и SS-DPS CT1103206303 (справа). Желтая пунктирная линия обозначает расстояния между атомами, которые меньше или равны 2,5 Å, что соответствует длине водородной связи согласно геометрическому критерию; атомы Phe3 (слева) и аминокислотные остатки, участвующие в связывании лиганда (справа), подписаны. Красными кругами обозначена связь в структуре пептидогликана, которая расщепляется EndoT5 [3].

Если рассмотреть фрагмент множественного выравнивания аминокислотных последовательностей эндолизинов семейства M15_C (рисунок 11), приведенного в исследовании [2], с учетом обнаруженных нами аминокислотных остатков, принимающих участие в связывании субстрата (Phe3 и Arg26 – Tyr33), можно установить, что большинство перечисленных остатков (Phe3, Arg26, Ala27, Glu29 и Pro32 у эндолизина T5) входит в консенсусную последовательность.

	1	10	20	30	40	50
phiEcoM-GJ1	..MN	VKLGQR	SLDR	LKGV	NPLVAVFK	RACETMPEFDVTVLEGLRSYERQ
ST32	..MSN	VKLGQR	SLDR	LKGV	NPSLVAVFK	RACETMPEFDVTVLEGLRTRYERQ
vB_EcoM_4HA13	..MSN	VKLGQR	SLDR	LSGV	NSSLVAVLKK	RACESMPEFDITVLEGLVRSYERQ
vB_PagM_SSEM1	..MSN	VKLSAS	SQAKLN	QVRMDLR	KVKCAKAFETLPEFDVTVLEGLRSQK	RQAEELYAQGATKV
3/49	..MAY	SLGNRS	SKSNLA	GVNADLVR	VVERAIQITD	VDFTVIEGLRTKERQVQLFKDGKTRT
vB_PmiM_Pm5461	..MY	VLSQRS	SKDR	LKGV	NPDLVKVV	VERAIOISEIDFMVIEGLVRTLEKQ
phiP4-3	..MY	VLSQRS	SKDR	LKGV	KPELVKVV	VERAIOITEIDFMVIEGLRSVEQ
phiP27	MSGK	FRFSRR	SEKNLE	GVK	PQLVAVVRR	RALELTEVDFGITEGLRTKERQKQLVAEGKSQT
P88	MSNT	FKFSSRS	SEKNLQ	GVN	PDLVKVV	TRRALEISEVDFGITEGLRSRYRQKQLVATGKSQT
RB49	..MF	KLSQRS	SKDR	LVGV	HPDLVKVV	HRALELTPVDFGITEGLVRSLETQ
Phil	..MF	KLSQRS	SKDR	LVGV	HPDLVKVV	HRALELTPVDFGITEGLVRSLETQ
phiTE	..MA	FVLGKRS	SLERL	LKGV	HDPDLVKVV	KLALTKVDRDFTVGEGLRTIETQ
eiAU-183	..MF	KLSRS	SLSR	LDGV	HPDLVVR	VVKRALELTPVDFTVIEGLRRSVE
KP15	..MF	KFSQK	SLNNL	LKGV	KPELVKVV	VERALQLSPVDFGVREGLRTVE
KP27	..MF	KFSQK	SLNNL	LKGV	KPQLVKVV	VERALQLSPVDFGVREGLRTVE
vB_CsaM_GAP161	..MF	KFSQK	SLNNL	LQGV	KPELVKVV	KRALELSPVDFGVREGLRTVE
RB43	..MF	KLAKK	SINNL	LKGV	KPELVKVV	QRALELSPDFGVREGLRTVE
T5	..MS	FKFGKN	SEKQLA	TVK	PELQKVAR	RALELSPYDFTTIVQGI
phiR2-01	..MS	FKFGKN	SEKQLA	TVK	PELQKVAR	RALELSPHDFTTIVQGI
vB_Kpn_IME260	..MS	FRFGNR	SLQQLD	TVDP	KLKALAIR	RALELSPHDFTTIQGRRTV
DU_PP_V	..MS	FRFGSR	SLAQLD	TVK	PQLKELAI	QVLSVSPIDFTTVIQGRRTLS
Shivani	..MS	FKFGKRS	SLDR	LKGV	HDPDLV	RVTHRALELSPYDFTTITEGLRSLE

Рисунок 11 – Фрагмент множественного выравнивания аминокислотных последовательностей гомологичных эндолизинов, принадлежащих к классу *Caudoviricetes* (в скобках указаны номера белков в базе данных GenBank): phiEcoM-GJ1 — фаг *Escherichia* phiEcoM-GJ1 (YP_001595416.1), ST32 — фаг *Escherichia* ST32 (YP_009790684.1), vB_EcoM_4HA13 — фаг *Escherichia* vB_EcoM_4HA13 (YP_009884078.1), vB_PagM_SSEM1 — фаг *Pantoea* vB_PagM_SSEM1 (YP_009859342.1), 3/49 — фаг *Shewanella* sp. 3/49 (YP_009103932.1), vB_PmiM_Pm5461 — фаг *Proteus* vB_PmiM_Pm5461 (YP_009195522.1), phiP4-3 — фаг *Proteus* phiP4-3 (YP_010093702.1), phiP27 — фаг *Enterobacteria* phiP27 (NP_543082.1), P88 — фаг *Escherichia* P88 (YP_009113074.1), RB49 — фаг *Enterobacteria* RB49 (NP_891673.1), Phil1 — фаг *Escherichia* Phi1 (YP_001469446.1), phiTE — фаг *Pectobacterium* phiTE (YP_007392609.1), eiAU-183 — фаг *Edwardsiella* eiAU-183 (YP_009004687.1), KP15 — фаг *Klebsiella* KP15 (YP_003580002.1), KP27 — фаг *Klebsiella* KP27 (YP_007348788.1), vB_CsaM_GAP161 — фаг *Cronobacter* vB_CsaM_GAP161 (YP_006986425.1), RB43 — фаг *Enterobacteria* RB43 (YP_239135.1), T5 — фаг *Escherichia* T5 (AAS19387.1), phiR2-01 — фаг *Yersinia* phiR2-01 (YP_007237012.1), vB_Kpn_IME260 — фаг *Klebsiella* vB_Kpn_IME260 (YP_009597415.1), vB_PP_V — фаг *Pectobacterium* DU_PP_V (YP_009795235.1), Shivani — фаг *Salmonella* Shivani (YP_009194685.1). Консервативные аминокислоты выделены красным цветом; аминокислоты, входящие в консенсусную последовательность, выделены желтым цветом. Воспроизведено из [2].

В частности, аминокислотные остатки, аналогичные Phe3, Arg26, Ala27, Glu29 и Pro32 у эндолизина T5, также присутствуют в структурах эндолизинов следующих бактериофагов: RB49 (остатки Phe2, Arg25, Ala26, Glu28 и Pro31), Phi1, eiAU-183, vB_CsaM_GAP161, RB43, phiR2-01, vB_Kpn_IME260 и Shivani. Это позволяет сделать вывод об обнаружении нами участка аминокислотной последовательности, отвечающего за связывание субстрата и характерного для ряда эндолизинов семейства M15_C.

По результатам «слепого» докинга гипотеза об участии остатка Trp114 в связывании с субстратом не подтвердилась. Несмотря на необходимость экспериментального установления конкретных боковых цепей аминокислотных остатков EndoT5, участвующих в связывании, полученные результаты позволяют рассматривать предположение об общей утрате мутантом EndoT5W114A структуры, оптимальной для поддержания функций, как наиболее вероятное на данном этапе исследования.

4. Сравнительный анализ динамических особенностей эндолизинов T5 и PlyG *in silico*

В данной работе методами молекулярной динамики (МД) и анализа нормальных мод (АНМ) изучались динамические особенности однодоменного эндолизина EndoT5 и многодоменного эндолизина PlyG для установления различий в подвижности участков белковой цепи, характерных для бактериофагов с грамотрицательными и грамположительными клетками-хозяевами.

RMSF (усредненные по времени среднеквадратичные отклонения координат атомов), рассчитанные по траекториям движения атомов, полученным в ходе выполнения МД, приведены на рисунках 12 и 14. Графики RMSF были визуализированы с помощью пакета matplotlib языка Python. RMSF, рассчитанные с применением АНМ, приведены на рисунках 13 и 15 [4]. Как видно из рисунков 12 – 15, обнаруженные участки структуры белка, для которых характерна

наибольшая подвижность атомов основной цепи, совпадают при использовании МД и АНМ.

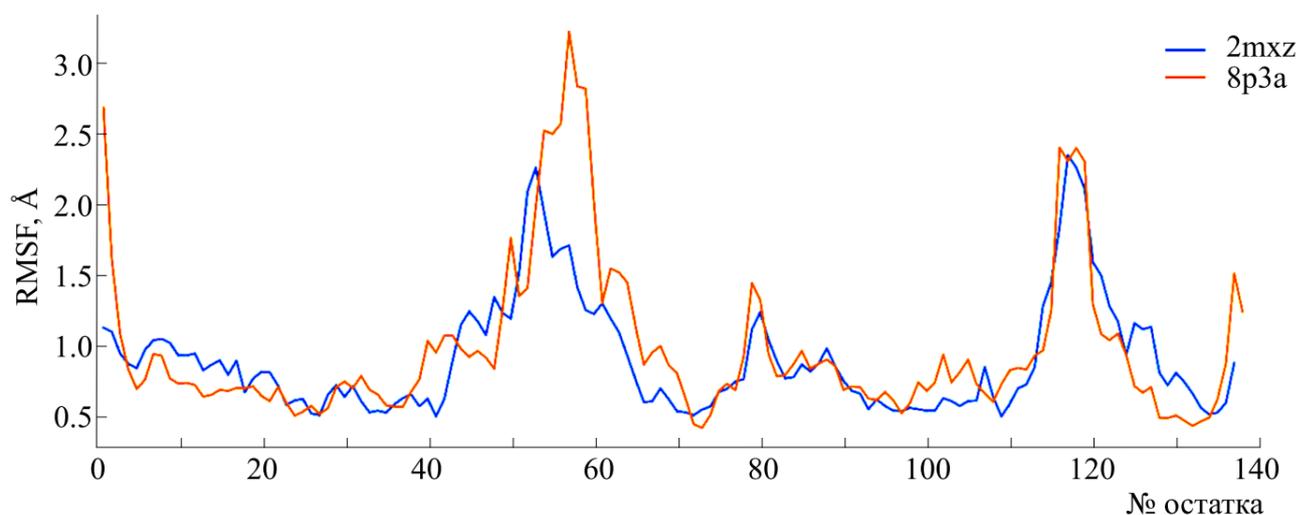


Рисунок 12 – RMSF, полученные в ходе проведения МД для остатков EndoT5-Zn²⁺ (2mxz) и EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺ (8p3a). Воспроизведено из [4].

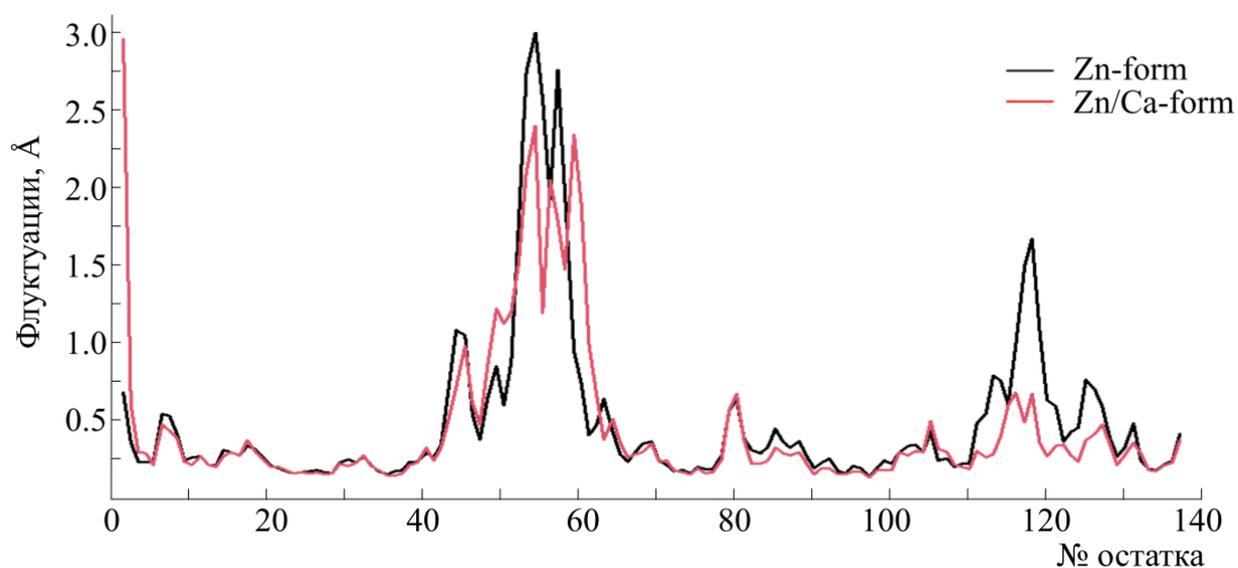


Рисунок 13 – RMSF, полученные в ходе проведения АНМ для остатков EndoT5-Zn²⁺ (Zn-form) и EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺ (Zn-Ca-form). Воспроизведено из [4].

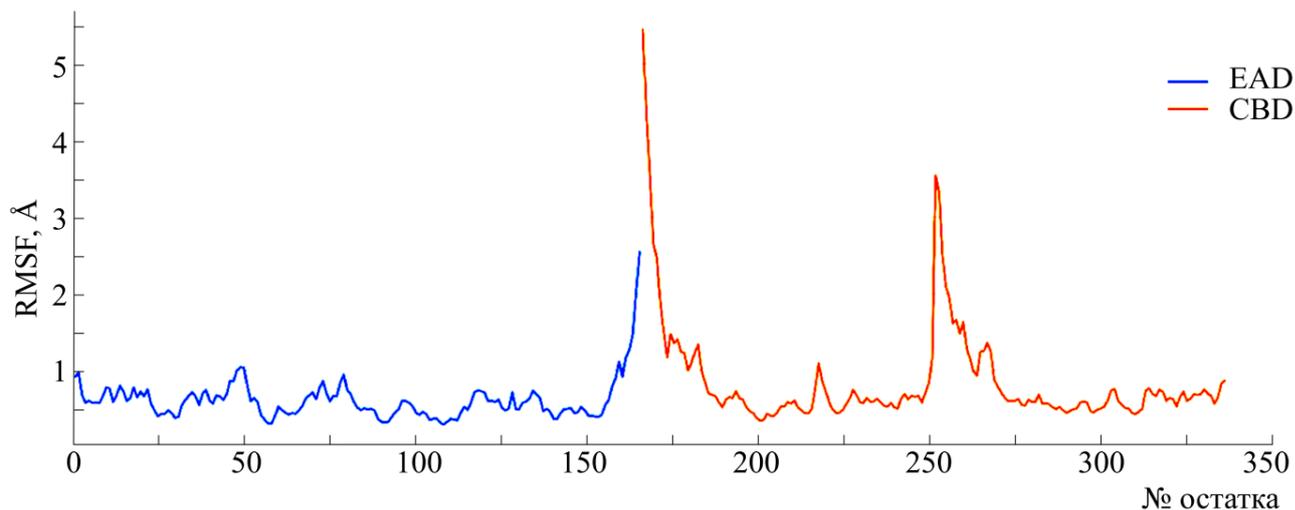


Рисунок 14 – RMSF, полученные в ходе проведения МД для остатков PlyG-EAD (EAD) и PlyG-CBD (CBD). Воспроизведено из [4].

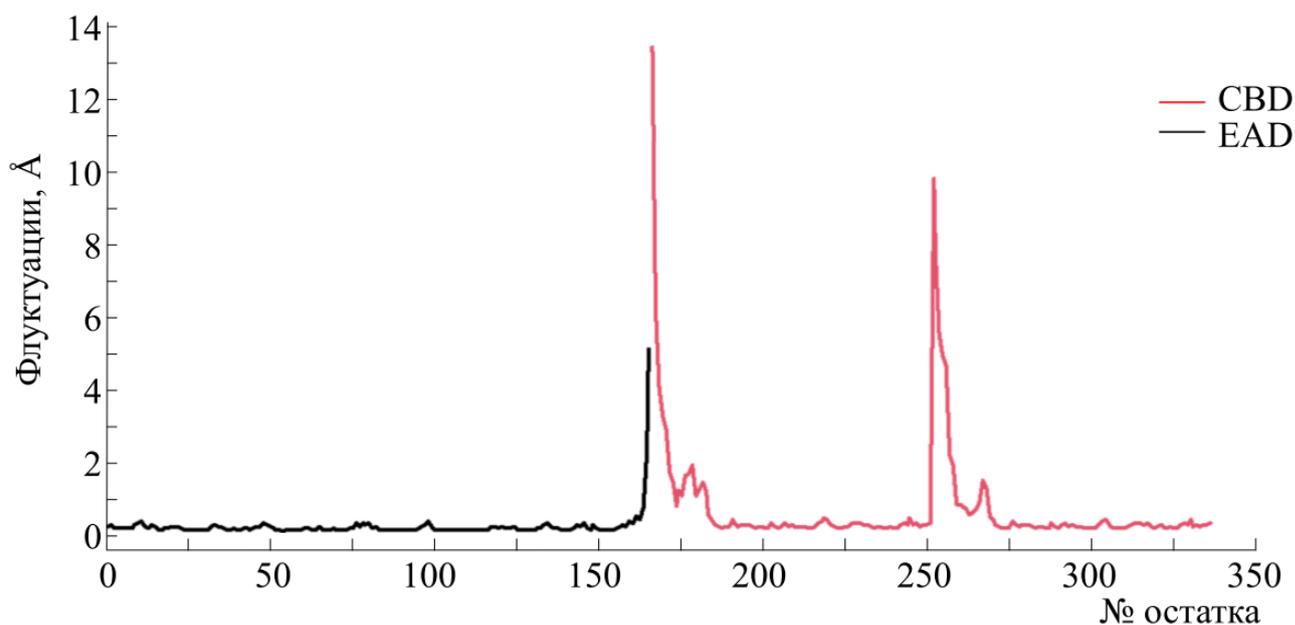


Рисунок 15 – RMSF, полученные в ходе проведения АНМ для остатков PlyG-EAD (EAD) и PlyG-CBD (CBD). Воспроизведено из [4].

Полученные данные (рисунки 12 и 13) показывают, что для EndoT5 наибольшая подвижность наблюдается в областях расположения петель, образованных остатками Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132. Результаты анализа подвижности участков цепи EndoT5, полученные в данном исследовании методами

МД и АНМ (рисунки 12 и 13) [4], согласуются как между собой, так и с экспериментальными данными, полученными методом ЯМР-спектроскопии.

При этом для PlyG (рисунки 14 и 15) подвижность выражена только в области расположения линкера, связывающего два домена (Asn158 – Gln167) [4]. Наличие второго пика на рисунках 14 и 15, соответствующего подвижности PlyG-CBD в области 250 аминокислотного остатка, объясняется тем, что депонированная структура PlyG-CBD представляет собой димер субстрат-связывающего домена. Таким образом, оба пика на рисунках 14 и 15 соответствуют подвижности линкера Asn158 – Gln167, соединяющего PlyG-EAD и PlyG-CBD.

На рисунках 16 и 17 приведены трехмерные структуры белков с учетом коэффициентов корреляции, полученные на основе динамических матриц кросс-корреляции [4]. Коэффициент корреляции принимает значения от -1 до 1. Если коэффициент корреляции флуктуаций атомов двух аминокислотных остатков равен 1, то колебания данных двух остатков имеют одинаковый период и одинаковую фазу. Если коэффициент корреляции флуктуаций атомов двух аминокислотных остатков равен -1, то колебания данных двух остатков имеют одинаковый период и противоположные фазы. В том случае, если этот коэффициент равен 0, колебания двух вышеупомянутых остатков не коррелированы.

Благодаря полученным данным о кросс-корреляции смещений атомов [4], можно дать детальное объяснение причин кальциевой активации EndoT5, основанное на изучении структуры белка. Для этой цели будут использованы кросс-корреляции смещений (флуктуаций) атомов, приведенные на рисунке 16 [4].

Из рисунка 16 видно, что цинковая форма EndoT5 способна к «ножницеобразному» движению петель Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132, при этом концы петель движутся как отдельные жесткие фрагменты [4].

Согласно рисунку 13, амплитуда этого движения в наносекундном и субнаносекундном диапазонах, характерных для метода АНМ, превышает амплитуду движения, доступную для петель Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132 цинк-кальциевой формы EndoT5. У последней, между тем, способна к движению «вверх-

вниз» петля Gly40 – Asp70 при малоподвижности петли Gly111 – Gly132 [4], что обеспечивает преобладание каталитически активной «открытой» конформации EndoT5.

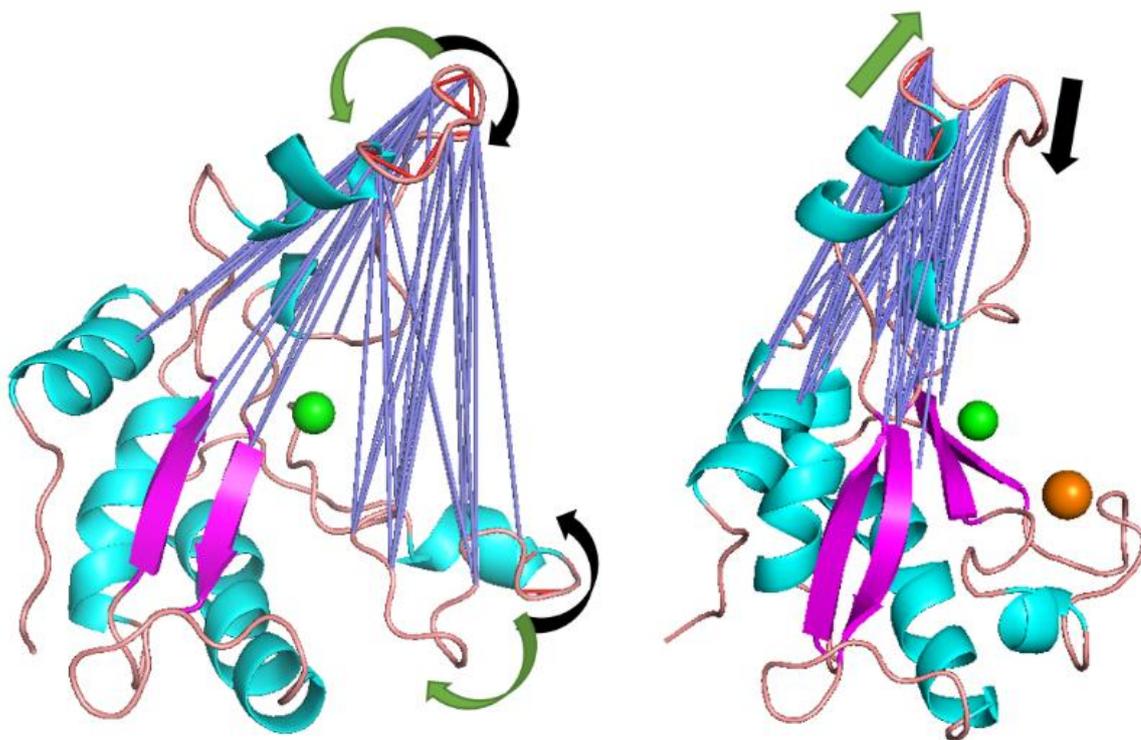


Рисунок 16 - Кросс-корреляции смещений атомов для EndoT5-Zn²⁺ (слева) и EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺ (справа). Ионы Zn²⁺ обозначены зелеными сферами, ионы Ca²⁺ обозначены оранжевыми сферами. Красные линии соединяют атомы основной цепи с положительным коэффициентом корреляции флуктуаций [0,8; 1]. Синие линии соединяют атомы основной цепи с отрицательным коэффициентом корреляции флуктуаций [-0,6; -0,4]. Черные стрелки указывают направление движения, в результате которого петли, образованные аминокислотными остатками Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132 сближаются. Зеленые стрелки указывают направление движения, в результате которого вышеуказанные петли отдаляются друг от друга. Воспроизведено из [4].

Фиксация петли Gly111 – Gly132 и изменение характера движения Gly40 – Asp70 (рисунок 16) приводит к тому, что активный центр белка более «доступен» для взаимодействия с пептидогликаном [4].

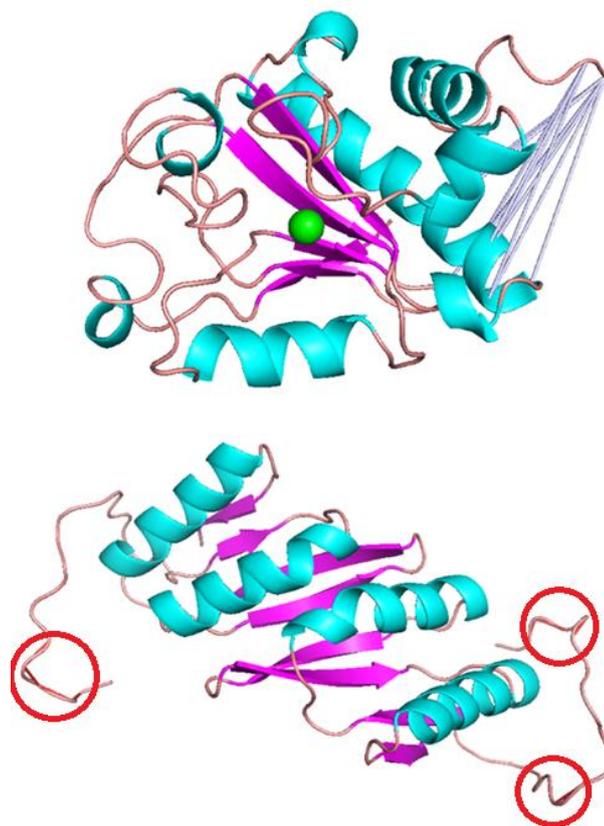


Рисунок 17 - Кросс-корреляции смещений атомов для PlyG-EAD (вверху) и PlyG-CBD (внизу). Ионы Zn^{2+} обозначены зелеными сферами. Красные линии соединяют атомы основной цепи с положительным коэффициентом корреляции флуктуаций $[0,8; 1]$ (выделенные красными окружностями), синие линии соединяют атомы основной цепи с отрицательным коэффициентом корреляции флуктуаций $[-0,4; -0,2]$. Адаптировано из [4].

Движение петли Gly40 – Asp70 «вверх-вниз» также происходит быстрее, чем «ножницеобразное» движение петель Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132, что видно из результатов МД (рисунок 12): в субпикосекундном диапазоне цинк-кальциевая форма EndoT5 имеет более подвижную петлю Gly40 – Asp70 с петлей Gly111 – Gly132, сравнимой по подвижности с цинковой формой EndoT5 [4].

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 рисунке 18. Из этой диаграммы видно, что коррелированность

флуктуаций атомов аминокислотных остатков, находящихся на несвязанных участках полипептидной цепи PlyG-EAD, менее выражена. При этом распределение коэффициентов кросс-корреляции PlyG-EAD характеризуется меньшей шириной, чем у трех других исследованных белковых структур. Это можно объяснить тем, что PlyG-EAD и PlyG-CBD зафиксированы в конформации, соответствующей активной форме эндолизина PlyG, в то время как подвижность белка (согласно рисункам 14 и 15), позволяющая реализовать механизмы связывания с субстратом (с помощью PlyG-CBD) и катализа (с помощью PlyG-EAD) обеспечивается, в основном, наличием гибкого линкера, соединяющего EAD и CBD.

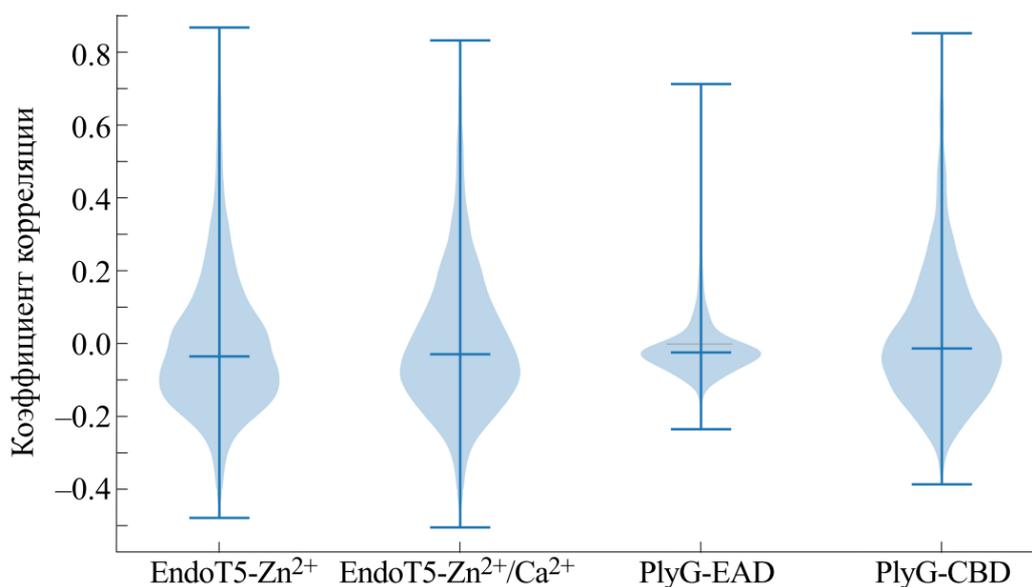


Рисунок 17 - Скрипичная диаграмма, соответствующая распределению коэффициентов кросс-корреляции EndoT5-Zn²⁺, EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺, PlyG-EAD и PlyG-CBD. Воспроизведено из [4].

На основании распределения коэффициентов кросс-корреляции (рисунок 17) можно предположить, что степень коррелированности флуктуаций атомов аминокислотных остатков полипептидной цепи является принципиальным различием между однодоменными эндолизинами и EAD многодоменных эндолизинов [4]. В настоящее время проверка данного предположения невозможна

из-за отсутствия достаточного количества структур эндолизинов, изученных методами ЯМР-спектроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эндолизины бактериофагов, компоненты комплексов литических ферментов фагов, разрушающие пептидогликан клеточных стенок клеток-хозяев, также могут связывать пептидогликан, и этот процесс оказывает значительное влияние на антибактериальные свойства эндолизинов и эффективность их применения против колоний клеток-хозяев. В то время, как механизм разрушения связей пептидогликана эндолизинами различных классов известен и зачастую легко предсказывается на основании первичной структуры белка, механизм связывания эндолизина с пептидогликаном остается недостаточно изученным. Например, несмотря на то, что на данный момент существует ряд стандартных типов укладки субстрат-связывающих доменов многодоменных эндолизинов, данные о конкретных участках структуры пептидогликана, участвующих в связывании, единичны и чаще всего являются экстраполяцией результатов, полученных для модели субстрата, что связано со значительной сложностью трехмерной структуры пептидогликана. Кроме того, у однодоменных эндолизинов практически не существует установленных элементов структуры, участвующих в связывании субстрата, а единственным установленным критерием, по которому можно сделать вывод о способности каталитически активного домена связывать пептидогликан, является общий заряд молекулы белка. Наконец, у множества семейств белков не изучена роль консервативных аминокислот, не входящих в активный центр молекул.

В данной работе впервые была изучена роль консервативного триптофана в поддержании структуры и функций эндолизинов семейства M15_C, EndoT5 и EndoRB49, методами ЯМР-спектроскопии.

Также в данной работе методом молекулярного докинга были установлены два механизма связывания пептидогликана однодоменными эндолизинами, и

продемонстрированы различия в механизмах связывания, доступных непосредственно однодоменным эндолизинам, и отдельным каталитически активным доменам многодоменных эндолизинов. Оказалось, что помимо «полостного» связывания, непосредственно однодоменные эндолизины способны осуществлять N-концевое связывание субстрата. На основе полученных данных было показано, что N-конец однодоменных эндолизинов участвует в связывании субстрата при реализации любого из двух механизмов. Кроме того, был впервые обнаружен участок структуры, присущий консенсусной последовательности ряда эндолизинов семейства M15_C, потенциально отвечающий за связывание этих эндолизинов с пептидогликаном.

Наконец, методами МД и АНМ была проанализирована подвижность участков аминокислотной цепи однодоменного эндолизина EndoT5 в сравнении с подвижностью участков аминокислотной цепи многодоменного эндолизина PlyG. На основании кросс-корреляций смещений атомов EndoT5 было выдвинуто предположение о том, что активация EndoT5 ионом кальция приводит к преобладанию каталитически активной «открытой» конформации данного фермента в результате изменения «ножницеобразного» характера взаимного движения петель Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132 на движение петли Gly40 – Asp70 «вверх-вниз» над зафиксированной петлей Gly111 – Gly132. При этом данные о наибольшей подвижности участков аминокислотной цепи (конкретно) исследованных белков, полученные *in silico* и методами ЯМР-спектроскопии согласуются между собой.

В рамках выполненного исследования методами МД и АНМ также было показано, что подвижность многодоменного эндолизина PlyG обеспечивается, в основном, подвижной петлей, соединяющей два домена, а каталитически активный домен PlyG-EAD характеризуется менее выраженной корреляцией движений не связанных участков аминокислотной цепи, чем однодоменный EndoT5.

Таким образом, данная работа является исследованием в области молекулярной биофизики. Она вносит вклад в понимание механизмов

функционирования ферментов на молекулярном уровне, что позволяет в дальнейшем более эффективно применять эндолизины.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что одиночные домены эндолизинов способны связывать пептидогликан согласно двум механизмам: N-концевому и «полостному», причем у однодоменных эндолизинов бактериофагов, в отличие от одиночных каталитических доменов многодоменных эндолизинов, N-конец белка принимает участие в связывании субстрата.

2. Определено, что у эндолизинов семейства M15_C существует два элемента структуры, необходимых для поддержания их функций: консервативный остаток триптофана и ряд остатков (Phe3, Arg26, Ala27, Glu29 и Pro32 у эндолизина T5; Phe2, Arg25, Ala26, Glu28 и Pro31 у эндолизина RB49), отвечающих за связывание субстрата, присущих консесусной последовательности. Показано, что консервативный остаток триптофана эндолизинов M15_C необходим для поддержания оптимальной конформации как активного центра, так и гидрофобного ядра белковой глобулы.

3. Обнаружено, что активация EndoT5 ионом кальция вызывает изменение характера взаимного движения петель Gly40 – Asp70 и Gly111 – Gly132, что приводит к преобладанию каталитически активной, «открытой» конформации. В этом случае EndoT5-Zn²⁺ характеризуется «ножницеобразным» движением данных петель, в то время как EndoT5-Zn²⁺/Ca²⁺ имеет зафиксированную петлю Gly111 – Gly132, над которой петля Gly40 – Asp70 движется «вверх-вниз», оставляя активный центр более доступным для взаимодействия с бактериальным пептидогликаном.

4. Показано, что степень коррелированности движения не связанных участков структуры однодоменного EndoT5 выше, чем степень коррелированности движения не связанных участков структуры двухдоменного PlyG с подвижным линкером между доменами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Аракелян А.Г.*, Микулинская Г.В., Прохоров Д.А. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОЛИЗИНА БАКТЕРИОФАГА RB49. Материалы конференции «Теоретическая и экспериментальная биофизика», 14–16 февраля 2023 года. — Пушино: Синхробук (SynchrobookTM), 2023. — 118 с.
2. Mikoulinskaia G.V., Prokhorov D.A., Chernyshov S.V., Sitnikova D.S., *Arakelian A.G.*, Uversky, V.N. Conservative Tryptophan Residue in the Vicinity of an Active Site of the M15 Family 1,d-Peptidases: A Key Element in the Catalysis. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. Pp. 13249. **IF 5.6.**
3. *Arakelian A.G.*, Chuev G.N., Mamedov T.V. Molecular Docking of Endolysins for Studying Peptidoglycan Binding Mechanism. // Molecules. 2024. Vol. 29. 5386. **IF 4.6.**
4. *Arakelian A.G.*, Chuev G.N., Mamedov T.V., Arikov A., Ismailov K.R. Endolysins T5 and PlyG Dynamics: Comparative Analysis in silico // Biofizika. 2025. Vol. 70 (2). P. 295-304. **IF 1.2.**