

QSAR-АНАЛІЗ ВПЛИВУ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ПЕПТИДАЗИ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465

А.Г. Артеменко, С.С. Декіна*, І.І. Романовська, В.Є. Кузьмін

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, Україна

*Corresponding author: s.dekina@gmail.com

Received 28 October 2021; Accepted 24 December 2021

Проблематика. Каталітична активність ензимів, що є їх найважливішою характеристикою, може суттєво змінюватися під впливом ефекторів, наприклад іонів металів, і є предметом спеціальних досліджень, що важливі для біохімії, біотехнології, медицини та інших галузей науки. Зазвичай активність ензимів за наявності металів оцінюють за зміною швидкості ферментативної реакції. Однак проведення подібних експериментальних досліджень, особливо для нових ензимів, як у випадку з пептидазою *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, потребує значних ресурсів і розгорнутих кінетичних досліджень. Тому доцільним є застосування методів комп'ютерної хімії, базовою задачею якої є пошук залежності “структура–властивість”, для побудови моделі, що матиме змогу з високою вірогідністю оцінити вплив іонів металів на активність пептидази.

Мета. Розробка QSAR-моделей для аналізу і прогнозування впливу іонів металів на активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465.

Методика реалізації. Вплив іонів металів вивчали, визначаючи протеолітичну активність пептидази після сумісної інкубації впродовж 30 хв у 0,0167 М буферного розчину трис-НСІ (рН 7,5, 37 °С). Кінцева концентрація хлоридів металів Li^+ ; Na^+ ; K^+ ; Cs^+ ; Cu^{2+} ; Be^{2+} ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Sr^{2+} ; Ba^{2+} ; Zn^{2+} ; Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; Cr^{3+} ; Mn^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} у буферному розчині становила 4 ммоль/дм³. Для пошуку кількісного зв'язку “структура–властивість” використовували довідкові дані про властивості іонів металів та методи тренд-вектора і випадкового лісу.

Результати. Дослідження впливу іонів металів на протеолітичну активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 показало, що деякі іони металів (Li^+ , Mn^{2+} і Co^{2+}) активували пептидазу, а інші (Cu^{2+} , Be^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}) інгібували активність ензиму. Нелінійними методами тренд-вектора та випадкового лісу побудовано адекватні статистичні моделі без помилок класифікації та помилок прогнозу класу активності для тестового набору. Обидві моделі показують, що найважливішими характеристиками іонів металів, які мають вплив на активність ензиму, є електронегативність (EN_{Pol}), перший потенціал іонізації (IP_1), ентропія іонів у водному розчині (S) та енергія спорідненості до електрона (E_{ae}).

Висновки. Методи QSAR-аналізу в сукупності з нелінійними методами тренд-вектора та випадкового лісу дають змогу адекватно описати вплив іонів металів на активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 за рахунок дескрипторів, що відображають певний баланс їхніх електродонорних і електроакцепторних властивостей (електронегативність, перший потенціал іонізації, енергія спорідненості до електрона) та ступінь структурованості гідратної оболонки (ентропія сольватації іонів). Обидва статистичних методи дають близькі значення важливості дескрипторів, але тільки метод тренд-вектора дає змогу проаналізувати напрям впливу конкретних характеристик іонів.

Ключові слова: пептидаза *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465; іони металів; QSAR-аналіз; випадковий ліс; тренд-вектор; активність ензиму.

Вступ

Ензими – унікальні біокатализатори різноманітних біохімічних процесів – мають високу селективність, каталітичну активність, здатні зберігати свої властивості поза клітинами, що обумовлює їх практичне використання в медицині та різних галузях промисловості: фармацевтичній, харчовій, хімічній. За обсягом виробництва препарати ензимів займають серед біологічно активних речовин ключові позиції після анти-

біотиків і амінокислот. Найширше використання в промисловості мають гідролітичні, у т.ч. протеолітичні, ензими [1, 2].

Практичне застосування протеїназ (КФ 3.4.21-24) і пептидаз (КФ 3.4.11-15) у медицині різноманітне. Вони чинять тромболітичну та протизапальну дію. Однак найбільш значимим є їх застосування в хірургії для терапії ран різної етіології, що пов'язано з локальністю дії протеаз: швидким відторгненням нежиттєздатної тканини без впливу на здорові ділянки [3].

Особливу увагу дослідників привертають протеолітичні ензими мікробного походження, що мають комплексну протеолітичну активність, здатні до розщеплення нерозчинних білкових субстратів: фібрину, колагену, еластину, завдяки чому є перспективними для лікування ран і опіків. Дослідження цих ензимів мають важливі фундаментальні аспекти в галузі біохімії, мікробіології, медичної біотехнології, біомедицини для визначення їх структури, каталітичної активності, механізму дії, фізико-хімічних та біохімічних властивостей. Як у теоретичному аспекті, так і для створення нових біопродуктів, перспективних для використання у рановій терапії, актуальним є пошук інгібіторів і активаторів нових ензимів, до яких належить пептидаза *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, що має комплексну протеолітичну активність.

У роботі [3] розглядається вплив іонів металів на активність протеаз різного походження, який здійснюється за рахунок неспецифічного зв'язування іонів металів молекулами ензиму. Під дією таких ефекторів каталітична активність ензимів може змінюватись і залежати від типу взаємодії іонів металів із біологічною молекулою. Тому нове дослідження або доповнення існуючих знань про вплив подібних ефекторів на активність ензимів має як теоретичне, так і практичне значення. Однак проведення подібних експериментальних досліджень, особливо для нових ензимів, як у випадку з пептидазою *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, потребує значних ресурсів, насамперед достатньої кількості ензиму [4]. Тому доцільним є застосування методів комп'ютерної хімії, базовою задачею якої є пошук залежностей "структура–властивість" для побудови адекватних QSAR-моделей, здатних оцінити вплив іонів металів на активність пептидази.

Внесок фізико-хімічних параметрів, що описують властивості іонів металів, у зміну активності пептидази ми дослідили методами QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) моделювання. Раніше подібні дослідження нами були проведені для карбоксилестерази печінки свині, тирозинази та лізоциму, що дало змогу з високим ступенем вірогідності прогнозувати активність ензимів за наявності іонів металів [5, 6].

У цьому дослідженні ми ставимо за мету розробку QSAR-моделей для аналізу та прогнозування впливу іонів металів на активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465.

Матеріали і методи

У роботі використовували пептидазу *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, люб'язно надану проф. Л.Д. Варбанець, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, казеїн за Гаммерстеном, бичачий сироватковий альбумін (Sigma-Aldrich), хлориди металів (МЧП "ТОР").

Визначення вмісту білка проводили методом Лоурі в модифікації Хартрі [7]. Калібрувальний графік будували, використовуючи бичачий сироватковий альбумін, стандартизований за 280 нм, відповідно до $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,6$.

Загальну протеолітичну активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової та Вінцюнайте [8], який базується на кількісному визначенні тирозину, що вивільняється при гідролізі казеїну під дією досліджуваного ензиму. За одиницю активності (ПО – протеолітична одиниця) поклали здатність пептидази за 1 хв при 37 °С переводити казеїн у неосаджуваний трихлороцтовою кислотою стан у кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину.

Вплив іонів металів вивчали, визначаючи протеолітичну активність пептидази після сумісної інкубації впродовж 30 хв у 0,0167 М буферного розчину трис-НСІ (рН 7,5, 37 °С). Кінцева концентрація хлоридів металів Li^+ ; Na^+ ; K^+ ; Cs^+ ; Cu^{2+} ; Be^{2+} ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Sr^{2+} ; Ba^{2+} ; Zn^{2+} ; Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; Cr^{3+} ; Mn^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} у буферному розчині становила 4 ммоль/дм³.

Для пошуку зв'язку "структура–властивість" використовували довідкові дані про властивості іонів металів [9] та статистичні методи тренд-вектора (Т-вектора) [10, 11] і випадкового лісу [12, 13].

Метод Т-вектора ґрунтується на принциповій ідеї теорії розпізнавання образів – розбиття n об'єктів на два класи відносно середнього значення досліджуваної властивості (\bar{A}). Величини ($A_i - \bar{A}$) набувають для одного класу позитивних значень, а для іншого – негативних і тому можуть асоціюватися із зарядами. Звідси, аналогічно вектору дипольного моменту, Т-вектор характеризує в багатовимірному просторі структурних параметрів X_{ij} (i – номер молекули, j – номер структурного параметра) поділ зарядів, що відповідають активному і неактивному класам молекул. Кожна компонента Т-вектора визначається як

$$T_j = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (A_i - \bar{A}) \cdot X_{ij}$$

і відображає ступінь і напрям впливу j -го структурного параметра на величину активності A . Для розв'язання оберненої задачі (прогноз активності) використовується таке співвідношення:

$$\text{rank}(\hat{A}_i) = \text{rank} \left(\sum_{j=1}^m T_j X_{ij} \right). \quad (1)$$

Зазначимо, що кожна компонента T -вектора розраховується незалежно від інших, і її внесок у модель не налаштовується, тому вплив кількості використовуваних структурних параметрів на надійність моделі не такий критичний, як для регресійних методів. У запропонованому підході якість зв'язку структура–властивість оцінювалась за величиною коефіцієнта рангової кореляції (за Спірменом) між рангом заданої активності та рангом обчисленої активності. Стабільність моделі визначалась в умовах ковзного контролю, коли кожна молекула видалялась із навчальної вибірки і для неї здійснювався прогноз активності на основі отриманої моделі. Отриманий у таких умовах коефіцієнт детермінації Q^2 використовувався як характеристика стійкості моделі.

Також у роботі ми використовували метод випадкового лісу (RF – Random Forest) [10]. Він будується на основі методу класифікаційних дерев і фактично являє собою ансамбль дерев рішень [14]. Статистичний метод RF досить широко використовується для побудови QSAR-моделей завдяки таким своїм перевагам: відсутність проблеми перенавчання моделей і необхідності попереднього відбору змінних; адекватність внутрішньої процедури оцінки якості та прогнозу здатності моделей; стійкість моделей до наявності “шуму” у вихідній вибірці; ефективність роботи з великими базами даних; можливість інтерпретувати одержані моделі; можливість аналізувати вибірки, що включають сполуки з різним механізмом дії. Дані експериментів щодо впливу іонів металів на протеолітичну активність пептидази піддавали статистичній обробці відповідно до [15]. Оцінювали ступінь вірогідності результатів досліджень за кількості повторів $n = 5$ відносно вихідної активності пептидази (8,25 ПО/мг білка за хвилину). Ймовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95 % ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$).

Результати

На першому етапі досліджень проводили експериментальне визначення протеолітичної активності ензиму (вміст білка 2 мг/см³) після його інкубації з хлоридами металів у буферному розчині, який не містив у своєму складі додаткових катіонів металів. Інкубація була необхідна для процесу взаємодії ензиму з іонами металів. Концентрація солей металів 4 ммоль/дм³ була вибрана за результатами проведених досліджень.

Дослідження впливу 18 хлоридів металів на протеолітичну активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 показало, що їх додавання до розчину ензиму та інкубація протягом 30 хв у більшості випадків приводили до зміни ферментативної активності. Так, деякі іони металів (Li^+ , Mn^{2+} і Co^{2+}) активували пептидазу, а деякі (Cu^{2+} , Be^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}) – інгібували активність ензиму.

З рис. 1, на якому значення активності ензиму (%) під впливом іонів металів впорядковані за зростанням, видно, що вони добре діляться на два класи: неактивні ($A < A_{\text{cp}}$) й активні ($A > A_{\text{cp}}$), де $A_{\text{cp}} = 74,9$ – середнє значення активності, причому найбільше підвищення активності (+33,8 %) спостерігається саме в області A_{cp} між іонами Ni^{2+} та La^{3+} . Тому для побудови адекватних QSAR-моделей краще використовувати не величину активності, а її клас, для чого добре підходять класифікаційні статистичні методи. Саме тому далі в роботі для вирішення цього завдання використовували нелінійні методи тренд-вектора [10, 11] і випадкового лісу [12, 16], що добре зарекомендували себе раніше для побудови статистичних моделей на основі класифікаційних оцінок активності.

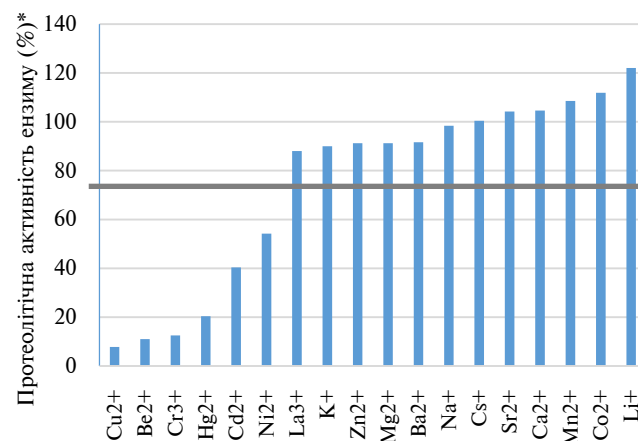


Рисунок 1: Протеолітична активність ензиму (% від вихідної) під впливом іонів металів та їх розподіл відносно середнього значення активності (* $p \leq 0,05$ порівняно з контролем, $n = 5$)

Значення протеолітичної активності пептидази (A_{obs}) та класу активності ($A_{obs. class}$) наведені в табл. 1.

Таблиця 1: Протеолітична активність пептидази після інкубації з хлоридами металів

Сполука	Іон металу	A_{obs}^*		$A_{obs. class}$
		ПО/мг білка за хв, $M \pm m$	%	
1	Li ⁺	10,06 ± 0,05	122,0	1
2	Na ⁺	8,1 ± 0,25	98,4	1
3	K ⁺	7,41 ± 0,29	90,0	1
4	Cs ⁺	8,27 ± 0,29	100,4	1
5	Be ²⁺	0,91 ± 0,05	11,0	0
6	Ca ²⁺	8,61 ± 0,43	104,6	1
7	Sr ²⁺	8,57 ± 0,43	104,2	1
8	Ba ²⁺	7,54 ± 0,38	91,6	1
9	Zn ²⁺	7,51 ± 0,38	91,2	1
10	Cd ²⁺	3,32 ± 0,17	40,4	0
11	Hg ²⁺	1,68 ± 0,08	20,4	0
12	Cr ³⁺	1,03 ± 0,05	12,5	0
13	Mn ²⁺	8,93 ± 0,44	108,5	1
14	Co ²⁺	9,21 ± 0,46	111,9	1
15	Ni ²⁺	4,46 ± 0,22	54,2	0
16	Cu ²⁺	0,64 ± 0,03	7,8	0
17	Mg ²⁺	7,51 ± 0,38	91,2	1
18	La ³⁺	7,22 ± 0,36	88,0	1

Примітки. Вихідна активність ензиму 8,25 ПО/мг білка за хв, * $p \leq 0,05$ порівняно з контролем; $n = 5$; A_{obs} – значення спостережуваної протеолітичної активності; $A_{obs. class}$ – значення спостережуваного класу протеолітичної активності.

Для можливості перевірки здатності моделей до прогнозу вибірку сполук було розділено на навчальну (сполуки 1–15) і тестову (сполуки 16–18). До тестової вибірки увійшли сполуки різних класів активності. Зробити тестову вибірку більш розширеною не було можливості через невелику кількість сполук, що досліджувались.

Для побудови QSAR-моделей аналізували близько 70-ти дескрипторів, що описують властивості іонів металів [9], в тому числі:

- ефективні заряди атомів у основному стані;
- потенціали іонізації елементів;
- енергії дисоціації для солей хлоридів металів;
- середні енергії зв'язків у молекулах типу MCl_x ;
- електронегативність елементів за шкалою Полінга;
- термодинамічні електронегативності;
- іонізаційні електронегативності елементів;
- довжини зв'язків у галогенідах типу $MeCl_x$;
- атомні радіуси;
- іонні радіуси;

- рекомендовані електронегативності елементів;
- спорідненість до електрона;
- основні термодинамічні характеристики;
- термодинамічні характеристики іонів і нейтральних молекул у водному розчині;
- енергія кристалічної решітки іонних сполук;
- стандартні електронні потенціали у водних розчинах та ін.

У результаті статистичного аналізу кожним зі статистичних методів (тренд-вектора та випадкового лісу) було отримано адекватні QSAR-моделі (M1 та M2 відповідно) **без помилок класифікації та помилок прогнозу** класу активності для тестового набору. В обох випадках тільки чотири дескриптори увійшли до моделей: перший потенціал іонізації (IP_1); ентропія іонів у водному розчині (S , Дж/моль·К); електронегативність елементів за шкалою Полінга (EN_{Pol}); енергія спорідненості до електрона (E_{ae} , eВ). Значення цих дескрипторів для різних іонів металів наведені в табл. 2.

Таблиця 2: Значення дескрипторів, що були відбрані для побудови статистичних моделей [11]

Сполука	Іон металу	IP_1 , eВ	S , Дж/моль·К	EN_{Pol}	E_{ae} , eВ
1	Li ⁺	5,39	13,4	0,98	0,618
2	Na ⁺	5,14	59	0,93	0,5479
3	K ⁺	4,34	102,5	0,82	0,5015
4	Cs ⁺	3,89	52,63	0,7	-0,39
5	Be ²⁺	9,32	75,8	1,57	-0,19
6	Ca ²⁺	6,11	-53,1	1,00	0,0246
7	Sr ²⁺	5,69	-26,4	0,95	1,51
8	Ba ²⁺	5,21	9,6	0,89	0,1446
9	Zn ²⁺	9,39	-112,1	1,65	-0,09
10	Cd ²⁺	8,99	-73,2	1,69	-0,27
11	Hg ²⁺	10,44	146	1,90	-0,19
12	Cr ³⁺	6,77	123	1,66	0,666
13	Mn ²⁺	7,43	-73,6	1,55	-0,97
14	Co ²⁺	7,88	-113	1,88	0,662
15	Ni ²⁺	7,64	97,7	1,91	1,156
16	Cu ²⁺	7,73	40,6	1,9	1,235
17	Mg ²⁺	7,65	-138,1	1,31	-0,22
18	La ³⁺	5,58	-217,6	1,1	0,47

Модель M1, побудована методом тренд-вектора (без помилок класифікації та помилок прогнозу). Для побудованої моделі коефіцієнт детермінації в умовах ковзного контролю становить $Q^2 = 0,70$, що вище допустимого значення 0,5. Внески параметрів (значення див. у табл. 2) у модель, що оцінювали за допомогою компонентів тренд-вектора, мають такі значення:

$$T(EN_{\text{Pol}}) = -0,53 \text{ (35 \%)};$$

$$T(IP_1) = -0,50 \text{ (33 \%)};$$

$$T(S) = -0,39 \text{ (26 \%)};$$

$$T(E_{\text{ae}}) = 0,09 \text{ (6 \%)}.$$

Негативні внески параметрів означають їх обернено пропорційний внесок, тобто збільшення значень цих параметрів призводить до зниження активності.

Аналіз модулів внесків структурних параметрів на досліджувану активність пептидази показав, що характеристики іонів, які визначають їх електронодонорні та електроноакцепторні властивості (EN_{Pol} , IP_1 , E_{ae}) більш суттєво впливають на активність ензиму, ніж сольватаційні (S) (рис. 2а). Незважаючи на найменший внесок енергії спорідненості до електрона E_{ae} , виключення дескриптора з моделі призводить до зменшення стійкості моделі, а саме до збільшення помилки прогнозу в умовах ковзного контролю.

Як було зазначено раніше, на основі компонент T -вектора можливо провести прогноз рангу активності за формулою (1). Якщо провести процедуру багатовимірного шкалювання [17] для відібраних чотирьох структурних параметрів з урахуванням їх внеску (компоненти T -вектора), то можна отримати візуальну картину, що показує диференціацію іонів металів у двох вимірах (рис. 3а).

Як видно з рис. 3а, всі менш активні іони металу відносно дії на пептидазу розміщені знизу від діагоналі, а всі більш активні іони – відповідно зверху. Розрахунок прогнозованих значень активності за формулою (1) (рис. 3б) дає аналогічну картину: всі менш активні іони металу мають негативні значення, а всі більш активні іони – позитивні.

Модель M2, побудована методом випадкового лісу (без помилок класифікації та помилок прогнозу). Стійкість моделі: в умовах *out of bag* вибірки [14] помилка класифікації становить $S(\text{oob}) = 0,33$. Інші статистичні характеристики в умовах

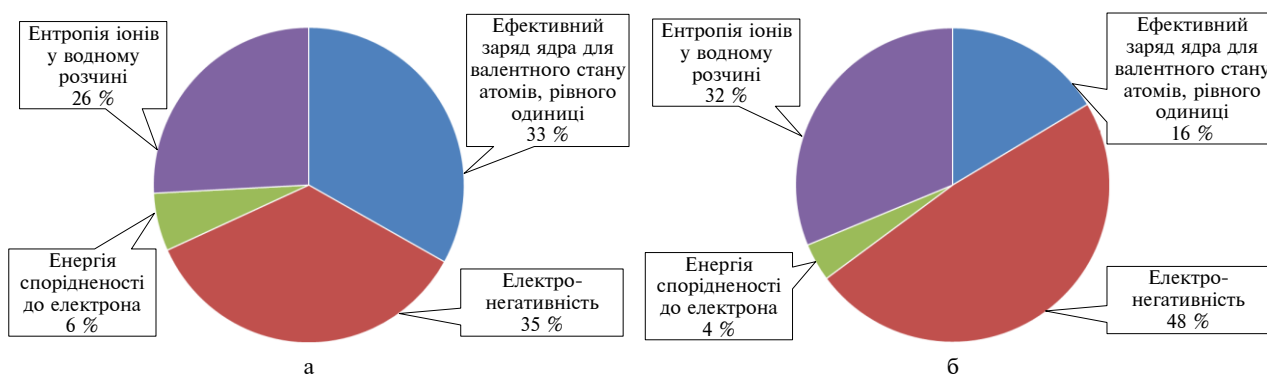


Рисунок 2: Оцінка впливу структурних параметрів іонів металів на активність пептидази, отримана на основі інтерпретації моделей M1 (а) та M2 (б)

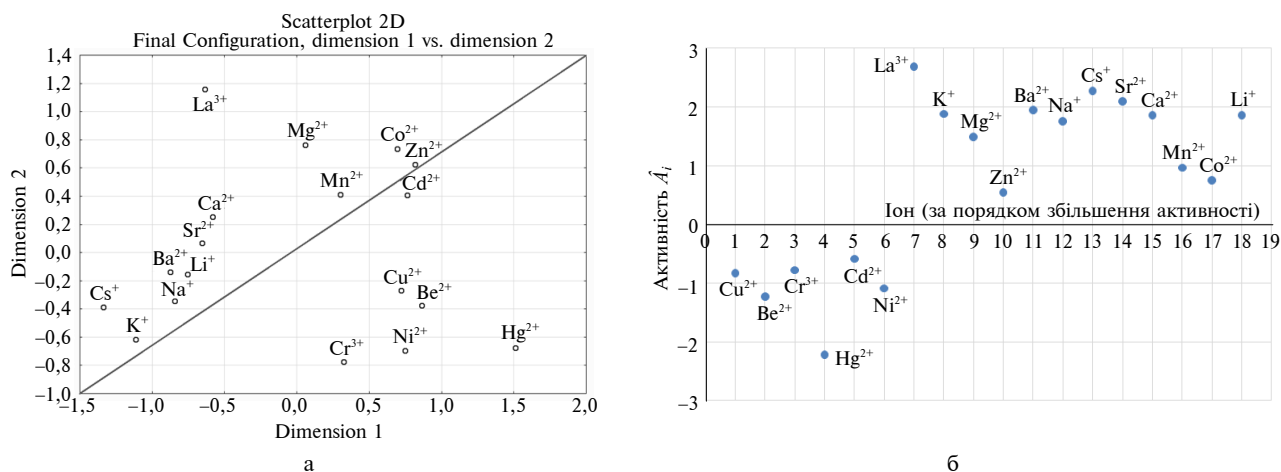


Рисунок 3: Розподіл іонів металів: (а) при багатовимірному шкалюванні [15] відібраних методом T -вектора структурних дескрипторів, (б) при розрахунку активності пептидази для різних іонів металів за формулою (1)

out of bag вибірки для цієї класифікаційної моделі є досить задовільними:

$$AC = 0,73; SP = 0,40; SE = 0,90,$$

де AC (точність, accuracy) = $(TP + TN)/(TP + TN + FP + FN)$; SP (специфічність, specificity) = $TN/(TN + FP)$; SE (чутливість, sensitivity) = $TP/(TP + FN)$; TP – кількість збігів для активних, TN – кількість збігів для неактивних; FP – кількість незбігів класів для активних; FN – FP – кількість незбігів класів для неактивних.

Важливість змінних, оцінена за алгоритмом, описаним у публікації [14], дає такі результати:

$$T(EN_{Pol}) = 0,062 (48 \%);$$

$$T(S) = 0,040 (32 \%);$$

$$T(IP_1) = 0,021 (16 \%);$$

$$T(E_{ac}) = 0,005 (4 \%).$$

Для моделі M2 (як і для M1) характеристики іонів, що визначають їх електронодонорні та електроноакцепторні властивості (EN_{Pol} , IP_1 , E_{ac}), більш суттєво впливають на активність ензиму, ніж термодинамічні (S) (див. рис. 2б). Як і у випадку з M1, незважаючи на найменший внесок енергії спорідненості до електрона E_{ac} , виключення дескриптора з моделі призводить до зменшення стійкості моделі, а саме до збільшення помилок передбачення в умовах *out of bag*. Напряму впливу змінних у межах методу лісу дерев оцінити неможливо в силу нелінійності моделі, але, як було показано вище, в межах методу тренд-вектора це можливо.

Обговорення

Найважливіша характеристика ензимів – каталітична активність – може суттєво змінюватися під впливом іонів металів і є предметом численних експериментів для можливості підвищення виходу протеїназ у різних фазах росту бактерій [1], вивчення механізмів дії [2, 3], структури ензимів тощо. Для вирішення цих завдань використовуються фізико-хімічні та біохімічні методи: УФ- й ІЧ-спектроскопія, динамічне світлорозсіювання, флуоресценція, ферментативна кінетика, які потребують значних ресурсів, масштабних експериментів. Одержані нами на першому етапі роботи результати з використанням методів біохімії та спектрофотометрії показали активуючий вплив деяких іонів металів (Li^+ , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+}) від-

носно протеолітичної активності пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, а також інгібуючий вплив (Cu^{2+} , Be^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}) на активність ензиму. Дані [18] також свідчать про підвищення (або зниження) активності протеолітичних ензимів під впливом іонів двовалентних металів. Так, для глутамілendonпептидази 2 *B. intermedius* встановлено, що за наявності 5 мМ іонів Mg^{2+} та Ca^{2+} її питома активність збільшується на 13 і 20 % відповідно; для субтилізиноподібної протеїнази 2 *B. intermedius* Mg^{2+} та Ca^{2+} у такій концентрації збільшують питому активність на 30 та 10 % відповідно. Автори [18] дійшли висновку, що для максимального накопичення протеїназ необхідно вносити у живильне середовище в пізню стаціонарну фазу росту *B. intermedius* 5 мМ Mg^{2+} та Ca^{2+} у концентрації 5 мМ. Подібні результати були отримані відносно біосинтезу глутамілendonпептидази 1 штамом *B. intermedius* та рекомбінантним штамом *B. subtilis*.

У роботі [19] встановлено позитивний вплив іонів двовалентних металів відносно активності металопротеїнази MprBi *B. intermedius* 3-19 і негативний – іонів Co^{2+} та Ni^{2+} у концентраціях від 1 до 20 мМ, причому зі збільшенням концентрації це зниження більш значне. Авторами досліджень [20] показано двократне збільшення активності кератинази *Thermoanaerobacter* sp. під впливом 5 мМ Mg^{2+} та її повне пригнічення 5 мМ Cu^{2+} .

Встановлено стабілізуючий вплив катіонів цинку (1 мМ) на активність пептидази *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324), що автори [21] пояснюють виникненням оптимальних умов для утворення потрійного комплексу: фермент–ефектор–субстрат і формування каталітично активної конформації ензиму.

Пригнічення активності протеази *Aspergillus niger* KIBGE-IB36 іонами Cs^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , V^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} і Al^{3+} автори також пояснюють конформаційними змінами білкової молекули [22].

Встановлено вплив іонів металів і механізм їх дії на ферментативний гідроліз лігноцелюлози з використанням комплексу фізико-хімічних методів і ферментативної кінетики [23]. Показано, що ступінь ферментативного гідролізу лігноцелюлози залежить від заряду іона метала та його концентрації. Виявлено, що при доданні Fe^{3+} максимальний ступінь гідролізу становив 44,5 % за масової концентрації Fe^{3+} 0,4 г/л. Результати використання динамічного світлорозсіювання та флуоресценції показали, що елект-

ростатична взаємодія між Fe^{3+} і карбоксильною групою ферменту сприяла стабілізації його конформації.

Таким чином, іони металів по-різному впливають на активність протеолітичних ензимів, на ступінь ферментативного гідролізу, і для оцінювання їх впливу потребується використання складних методів і ресурсів. Тому перспективним є застосування методів комп'ютерної хімії, основним завданням якої є пошук залежностей "структура—властивість" для побудови адекватних QSAR-моделей та оцінки і прогнозування впливу іонів металів на активність пептидази. В науковій літературі аналогічні відомості практично відсутні, подібні дослідження нами здійснено для карбоксилестерази печінки свині, тирозинази та лізоциму, що дало змогу з високим ступенем вірогідності прогнозувати активність ензимів за наявності іонів металів [24–26], ґрунтуючись на властивостях металів. Саме тому дослідження впливу іонів металів на протеолітичну активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 були проведені в аналогічних умовах (концентрації іонів металів, температура, час інкубації).

У нашій роботі вперше застосовані методи комп'ютерної хімії, що з високою долею вірогідності дають змогу оцінити вплив іонів металів на протеолітичну активність нового ензиму пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 та спрогнозувати їх дію.

Використання методів комп'ютерної хімії виправдало наші сподівання для пептидази, і в результаті проведених досліджень ми отримали адекватні QSAR-моделі (M1 та M2 відповідно),

що дають змогу **без помилок класифікації та помилок прогнозу** відносити іони металів до певного класу активності для тестового набору. Використовуючи обидві моделі та маючи чотири найважливіших дескриптори, а саме: перший потенціал іонізації (IP_1); ентропію іонів у водному розчині (S , Дж/моль·К); електронегативність елементів за шкалою Полінга (EN_{Pol}); енергію спорідненості до електрона (E_{ae} , eВ), можливо прогнозувати вплив металу на каталітичну активність нового ензиму, що може бути корисним для подальших біохімічних і біотехнологічних досліджень. Отримані результати є оригінальними, раніше не були описані в літературі та свідчать про перспективи використання методів комп'ютерної хімії для потреб ензимології.

Висновки

Методи QSAR-аналізу в сукупності з нелінійними методами тренд-вектора та випадкового лісу дають змогу адекватно описати вплив іонів металів на активність пептидази *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 за рахунок дескрипторів, що відображають певний баланс їх електронодонорних та електроноакцепторних властивостей (електронегативність, перший потенціал іонізації, енергія спорідненості до електрона) та ступінь структурованості гідратної оболонки (ентропія сольватації іонів). Обидва статистичних методи дають близькі значення важливості дескрипторів, але тільки метод тренд-вектора дає можливість оцінити напрям впливу конкретних характеристик іонів.

References

- [1] Falch EA. Industrial enzymes — developments in production and application. *Biotechnol Advan.* 1991;9(4):643–58. DOI: 10.1016/0734-9750(91)90736-f
- [2] Trincone A. Potential biocatalysts originating from sea environments. *J Molec Catal B Enzym.* 2010;66(3–4):241–56. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.06.004
- [3] Belov AA, Vaniushenkova AA, Dosadina EE, Khanafina AA. New textile dressings based on biodegradable polymers containing proteinases for wounds and burns treatment. *Wounds Wound Infect.* 2018;15(1):16–26. DOI: 10.25199/2408-9613-2018-5-1-16-26
- [4] Varbanets LD, Nidialkova NA, Seifullina II, Pulia AV, Skorokhod LS. Modification *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 peptidase activity by hydrazide/hydrozonecomplexes of 3d-metals. *J Microbiol.* 2017;79(3):14–26.
- [5] Sayem SM, Abu A, Jahangir H, Mozammel M. Effect of temperature, pH and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK03. *Proc Pakistan Acad Sci.* 2006;43(4):257–62.
- [6] Shukor YM, Noor B, Nafisah J, Abdullah J, Shamaan M, Syed NA. An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008;144(3):283–91. DOI: 10.1007/s12010-007-8063-5
- [7] Hatree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *J Anal Biochem.* 1972;48(2):422–7. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90094-2

- [8] Petrova IS, Vintsyunaite MN. Determination of proteolytic activity of enzyme preparations of microbial origin. *Appl Biochem Microbiol.* 1966;2(1):322-7.
- [9] Volkov AI, Zharskiy IM. Large Chemical Reference Book. Minsk: Sovremennaya Shkola; 2005.
- [10] Carhart RE, Smith DH, Venkataraghavan R. Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications. *J Chem Inf Comput Sci.* 1985;25(2):64-73. DOI: 10.1021/ci00046a002
- [11] Vityuk NV, Kuzmin VK. Mechanistic models in chemometrics for the analysis of multivariate research data. Analog of the method of dipole moments in the analysis of the structure (composition)-property relationship. *J Analyt Chem.* 1994;49(2):165.
- [12] Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. Classification and regression trees. Boca Raton: Routledge; 2017. 368 p. DOI: 10.1201/9781315139470
- [13] Kuz'min VE, Polishchuk PG, Artemenko AG, Andronati SA. Interpretation of QSAR models based on random forest methods. *Mol Inf.* 2011;30(6-7):593-603. DOI: 10.1002/minf.201000173
- [14] Svetnik V, Liaw A, Tong C, Culberson JC, Sheridan RP, Feuston BP. A classification and regression tool for compound classification and QSAR modeling. *J Chem Inform Comp Sci.* 2003;43(6):1947-58. DOI: 10.1021/ci034160g
- [15] Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistical methods in biomedical research using excel. 2nd edition. Kyiv: Morion; 2001.
- [16] Raymond EC, Dennis HS, Venkataraghavan R. Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications. *J Chem Inf Comput Sci.* 1985;25(2):64-73. DOI: 10.1021/ci00046a002
- [17] Borg I, Groenen PJF. Modern multidimensional scaling: Theory and applications. 2nd edition. New York: Springer; 2005. DOI: 10.1007/0-387-28981-X
- [18] Kirillova YM, Mikhailova EO, Balaban N, Mardanova AM. Biosynthesis of the *Bacillus intermedius* subtilisin-like serine proteinase by the recombinant. *Microbiology.* 2006;75(2):142-7. DOI: 10.1134/S0026261706020068
- [19] Sabirova AR, Rudakova NL, Balaban NP, Ilyinskaya ON, Demidyuk IV, Kostrov SV, et al. A novel secreted metalloproteinase *Bacillus intermedius*. *FEBS Lett.* 2010;584(21):4419-25. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.09.049
- [20] Kublanov IV, Tsurul'nikov KB, Kaliberda EN, Rumsh LD, Haertle T, Bonch-Osmolovskaia EA. Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal Rift zone. *Mikrobiologiya.* 2009;78(1):79-88.
- [21] Matselyukh OV, Nidialkova NA, Varbanets LD. Purification and physicochemical properties of *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 peptidase with elastolytic and fibrinolytic activity. *Ukr Biochem J.* 2012;84(2):25-36.
- [22] Qader UI, Sattar SA, Afshen HA. Effect of metal ions, solvents and surfactants on the activity of protease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *J Basic Appl Sci.* 2017;13:491-5. DOI: 10.6000/1927-5129.2017.13.80
- [23] Wang SL, Yang J, Zhou Y, Xu B. Effects and mechanism of metal ions on enzymatic hydrolysis of wheat straw after pretreatment. *Bioresources.* 2018;13(2):2617-31. DOI: 10.15376/biores.13.2.2617-2631
- [24] Dekina SS, Hovsepyan AM, Artemenko AG, Romanovskaya II, Kuzmin VY. Investigation of metal ions influence on lysozyme activity by the QSAR analysis method. *Microbiol Biotechnol.* 2012;4:44-51. DOI: 10.18524/2307-4663.2012.4(20).91404
- [25] AAndronati SA, Shesterenko EA, Artemenko AG, Polishchuk PG, Muratov EN, Sevastyanov OV, et al. Study of the effect of metal ions on the activity of pig liver carboxylesterase by the QSAR method. *Rep Na Acad Sci Ukr.* 2012;9:154-8.
- [26] Shesterenko YA, Artemenko AG, Polishchuk PG, Muratov EN, Sevastyanov OV, Romanovskaya II, et al. QSPR analysis of the reactivity of tyrosinase substrates by the random forest method. *Rep Na Acad Sci Ukr.* 2010;5:181-6.

А.Г. Артеменко, С.С. Декина, И.И. Романовская, В.Е. Кузьмин

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина

QSAR-АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗЫ *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465

Проблематика. Каталитическая активность энзимов является их важнейшей характеристикой, может существенно изменяться под влиянием эффекторов, например ионов металлов, и является предметом специальных исследований, которые важны для биохимии, биотехнологии, медицины и других отраслей науки. Обычно активность энзимов в присутствии металлов оценивают по изменению скорости ферментативной реакции. Однако проведение подобных экспериментальных исследований, особенно для новых энзимов, как в случае пептидазы *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, требует значительных ресурсов и развернутых кинетических исследований. Поэтому целесообразно применение методов компьютерной химии, базовой задачей которой является поиск зависимости "структура-свойство", для построения модели, которая сможет с высокой долей вероятности оценить влияние ионов металлов на активность пептидазы.

Цель. Разработка QSAR-моделей для анализа и прогноза влияния ионов металлов на активность пептидазы *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465.

Методика реализации. Влияние ионов металлов изучали, определяя протеолитическую активность пептидазы после совместной инкубации в течение 30 мин в 0,0167 М буферного раствора трис-НСl (рН 7,5, 37 °С). Конечная концентрация хлоридов металлов Li^+ ; Na^+ ; K^+ ; Cs^+ ; Cu^{2+} ; Be^{2+} ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Sr^{2+} ; Ba^{2+} ; Zn^{2+} ; Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; Cr^{3+} ; Mn^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} в буферном растворе составляла 4 ммоль/дм³. Для поиска количественной связи "структура–свойство" использовали справочные данные о свойствах ионов металлов и методы тренд-вектора и случайного леса.

Результаты. Исследование влияния ионов металлов на протеолитическую активность пептидазы *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 показало, что некоторые ионы металлов (Li^+ , Mn^{2+} и Co^{2+}) активировали пептидазу, а другие (Cu^{2+} , Be^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}) ингибировали активность энзима. Нелинейными методами тренд-вектора и случайного леса построены адекватные статистические модели без ошибок классификации и ошибок прогноза класса активности для тестового набора. Обе модели показывают, что важнейшими характеристиками ионов металлов, влияющими на активность энзима, являются электроотрицательность (EN_{Pol}), первый потенциал ионизации (IP_1), энтропия ионов в водном растворе (S) и энергия сродства к электрону (E_{ae}).

Выводы. Методы QSAR-анализа в совокупности с нелинейными методами тренд-вектора и случайного леса позволяют адекватно описать влияние ионов металлов на активность пептидазы *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 за счет дескрипторов, отражающих определенный баланс их электронодонорных и электроноакцепторных свойств (электроотрицательность, первый потенциал ионизации, энергия сродства к электрону) и термодинамических свойств в водном растворе (энтропия сольватации ионов). Оба статистических метода дают близкие значения важности дескрипторов, но только метод тренд-вектора позволяет проанализировать направление влияния конкретных характеристик ионов.

Ключевые слова: пептидаза *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465; ионы металлов; QSAR-анализ; случайный лес; тренд-вектор; активность энзима.

A.G. Artemenko, S.S. Dekina, I.I. Romanovskaya, V.E. Kuzmin

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine, Odessa, Ukraine

QSAR ANALYSIS OF THE EFFECT OF METAL IONS ON THE PEPTIDASE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 ACTIVITY

Background. The catalytic activity of enzymes, which is their most important characteristic, can change significantly under the influence of effectors, for example, metal ions, and is the subject of special studies that are important for biochemistry, biotechnology, medicine, and other branches of science. Usually, the activity of enzymes in the presence of metals is assessed by the change in the rate of the enzymatic reaction. However, conducting such experimental studies, especially for new enzymes, as in the case of peptidase *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, requires significant resources and extensive kinetic studies. Therefore, it is advisable to use the methods of computational chemistry, the basic task of which is to search for the structure–property relationship, to build a model that can assess the effect of metal ions on peptidase activity with a high degree of probability.

Objective. We are aimed to develop QSAR models for analysis and prediction of the effect of metal ions on the activity of peptidase *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465.

Methods. The effect of metal ions was studied by determining the proteolytic activity of peptidase after co-incubation for 30 min in 0.0167 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.5, 37 °C). The final concentration of metal chlorides Li^+ ; Na^+ ; K^+ ; Cs^+ ; Cu^{2+} ; Be^{2+} ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Sr^{2+} ; Ba^{2+} ; Zn^{2+} ; Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; Cr^{3+} ; Mn^{2+} ; Co^{2+} ; Ni^{2+} in the buffer solution was 4 mmol/dm³. To search for the quantitative structure–property relationship, we used the reference data on the properties of metal ions, as well as trend vector and random forest methods.

Results. A study of the effect of metal ions on the proteolytic activity of peptidase *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 showed that some metal ions (Li^+ , Mn^{2+} и Co^{2+}) activated peptidase, while others (Cu^{2+} , Be^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+}) inhibited the enzyme activity. Adequate statistical models without classification errors and activity class prediction errors for the test set were constructed by nonlinear trend vector and random forest methods. Both models show that the most important characteristics of metal ions affecting enzyme activity are electronegativity (EN_{Pol}), the first ionization potential (IP_1), the entropy of ions in aqueous solution (S), and the electron affinity energy (E_{ae}).

Conclusions. QSAR analysis methods in combination with nonlinear trend vector and random forest methods allow adequately describing the effect of metal ions on the peptidase *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 activity due to descriptors reflecting a certain balance of their electron-donating and electron-accepting properties (electronegativity, the first ionization potential, the electron affinity energy) and thermodynamic properties in aqueous solution (entropy of solvation). Both statistical methods give similar values of the importance of descriptors, but only the trend vector method allows us to analyze the direction of influence of specific characteristics of ions.

Keywords: peptidase *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465; metal ions; QSAR analysis; random forest; trend vector; enzyme activity.