

Научная статья

УДК 579.22/577.29/577.151

EDN LGIDKE

doi: 10.17072/1994-9952-2025-1-32-42



## Моделирование белковой структуры $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. wratislaviensis* CH628

Татьяна Денисовна Кирьянова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия,  
kitadi2101@gmail.com

**Аннотация.** Выполнено моделирование трёхмерной структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы (BphA1) штамма *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 с использованием программ MODELLER, AlphaFold и trRosetta. Нуклеотидная последовательность гена *bphA* установлена при анализе полногеномной последовательности штамма в системе RAST. Филогенетический анализ *bphA*<sub>CH628</sub> показал высокую степень сходства с  $\alpha$ -субъединицей нафталин диоксигеназы (*narA*). Для оценки качества полученных моделей использовались программы ERRAT, VERIFY3D и PROCHECK. Модель BphA1<sub>CH628</sub>, построенная с помощью MODELLER, продемонстрировала наивысшую структурную точность, в то время как модель BphA1<sub>CH628</sub> AlphaFold лучше предсказала активный центр фермента. Анализ активного центра показал консервативность ключевых аминокислот, участвующих в катализе, что подтверждает функциональную схожесть с нафталин диоксигеназой. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего исследования BphA1 в контексте его применения в биоремедиации.

**Ключевые слова:** бифенил диоксигеназа, моделирование белков, AlphaFold, MODELLER, trRosetta, активный центр, *Rhodococcus*

**Для цитирования:** Кирьянова Т. Д. Моделирование белковой структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. wratislaviensis* CH628 // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2025. Вып. 1. С. 32–42. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2025-1-32-42>.

**Благодарности:** исследование выполнено в рамках гранта РФФ 24-24-00498.

## MICROBIOLOGY

Original article

## Modeling of the protein structure of the $\alpha$ -subunit of biphenyl 2,3-dioxygenase (BphA1) of the *R. wratislaviensis* strain CH628

Tatyana D. Kir'yanova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch RAS, Perm, Russia, kitadi2101@gmail.com

**Abstract.** Three-dimensional modeling of the  $\alpha$ -subunit of biphenyl dioxygenase (BphA1) from the *Rhodococcus wratislaviensis* strain CH628 was performed using MODELLER, AlphaFold, and trRosetta software. The nucleotide sequence of the *bphA* gene was determined through an analysis of the whole-genome sequence of the strain in the RAST system. Phylogenetic analysis of *bphA*<sub>CH628</sub> revealed a high degree of similarity with the  $\alpha$ -subunit of naphthalene dioxygenase (*narA*). To assess the quality of the generated models, ERRAT, VERIFY3D, and PROCHECK programs were employed. The BphA1<sub>CH628</sub> model constructed with MODELLER demonstrated the highest structural accuracy, while the BphA1<sub>CH628</sub> model from AlphaFold provided a better prediction of the enzyme's active site. Analysis of the active site indicated the conservation of key amino acids involved in catalysis, which supports the functional similarity to naphthalene dioxygenase. These findings open up new avenues for further investigation of BphA1 in the context of its application in the bioremediation.

**Keywords:** biphenyl dioxygenase, protein modeling, AlphaFold, MODELLER, trRosetta, active site, *Rhodococcus*

**For citation:** Kir'yanova T. D. [Modeling of the protein structure of the  $\alpha$ -subunit of biphenyl 2,3-dioxygenase (BphA1) of the *R. wratislaviensis* strain CH628]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 1 (2025): pp. 32-42. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2025-1-32-42>.

**Acknowledgments:** the research was carried out within the framework of the grant of the Russian Scientific Foundation No. 24-24-00498.

## Введение

Прогнозирование трехмерной структуры белка на основе аминокислотной последовательности является одной из ключевых задач в вычислительной биофизике и молекулярной биологии. Это направление имеет важное значение не только для фундаментальных научных исследований, но и для широкого спектра прикладных задач, таких как интерпретация геномов и прогнозирование функции белков. В последнее время значительный интерес привлекает обратная задача – проектирование последовательностей аминокислот для создания белков с заданной структурой и функциями, что открывает новые перспективы для биотехнологий и медицины [Kuhlman, Bradley, 2019].

Существуют два основных подхода к прогнозированию структуры белков: моделирование на основе шаблона и моделирование без шаблона. Моделирование на основе шаблона использует известные структуры родственных белков для предсказания структуры интересующего белка, тогда как методы без шаблона полагаются на выборку различных конформаций и энергетические оценки для предсказания новых структур. Оба подхода активно развиваются благодаря росту вычислительных мощностей и развитию алгоритмов машинного обучения, что позволяет более точно предсказывать структуры белков и их функциональные области [Jones et al., 2015; Wang et al., 2017].

Одним из важных белков, участвующих в биодegradации токсичных соединений, является бифенил диоксигеназа, ключевой фермент в разложении полихлорированных бифенилов (ПХБ). Эти загрязнители широко распространены в окружающей среде и являются серьезной экологической проблемой из-за их устойчивости к биодegradации и способности накапливаться в живых организмах. В связи с этим изучение структуры и функций бифенилдиоксигеназы является важным направлением исследований, которое может способствовать разработке эффективных методов биоремедиации. В настоящее время построены модели бифенил 2,3-диоксигеназы наиболее известных штаммов-деструкторов ПХБ: BphA1A2 штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 (PDB ID: 1ULI\_A), четыре возможных структуры бифенил 2,3-диоксигеназы штамма *Burkholderia xenovorans* LB400 (PDB ID: 5AEU\_A, 2YFI\_A, 2XSH\_A, 2XR8\_A), 3D-структура BphA1 в комплексе с бифенилом штамма *Comamonas testosteroni* B-356 (PDB ID: 3GZX\_A) [Furusawa et al., 2004; Colbert et al., 2013; Dhindwal et al., 2016]. Анализ полученных структур показал, что эффективность связывания фермента с конгенерами ПХБ зависит, в первую очередь, от размера и конфигурации каталитического кармана [Wang et al., 2021]. Среди аминокислот каталитического кармана наибольшее влияние на связывание бифенил 2,3-диоксигеназы с бифенилом оказывают Asp230, Gly335, Asn337, Thr338, Ile339 и Arg340, тогда как в случае, если субстратом является 4,4'-дихлорбифенил, наибольшее влияние оказывают Phe227, Ile336, Asn337, Ile339, Phe378 и Arg340 [Zhu et al., 2020]. Важно отметить, что среди ключевых аминокислот активного центра бифенил 2,3-диоксигеназы при связывании с незамещенным и дизамещенным бифенилом совпадают только 2 позиции: Asn337 и Arg340.

Моделирование структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенилдиоксигеназы (BphA1) штамма *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 представляет собой важный шаг на пути к созданию эффективных биотехнологических решений для борьбы с загрязнением ПХБ. Этот штамм выделен из почв, длительное время загрязненных хлорорганическими соединениями, и обладает способностью разлагать соединения группы стойких органических загрязнителей, что делает его перспективным для использования в экологических исследованиях и биотехнологиях [Egorova et al., 2017, 2020; Gorbunova et al., 2021].

Цель исследования – создание и анализ моделей  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы (BphA1) штамма *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 с использованием различных программ (MODELLER, AlphaFold и trRosetta).

## Материалы и методы исследования

### Бактериальный штамм

В работе использован штамм-деструктор полихлорированных бифенилов *Rhodococcus wratislaviensis* CH628, выделенный ранее из почвы, длительно загрязненной хлорорганическими соединениями [Egorova et al., 2017; Gorbunova et al., 2022]. Штамм CH628 идентифицирован на основании анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (GenBank KX034163) и морфофизиологических признаков.

### Построение модели $\alpha$ -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1)

Дедуктивная аминокислотная последовательность BphA1 штамма *R. wratislaviensis* CH628 получена на основании нуклеотидной последовательности гена bphA (GenBank MW070532), выявленного при анализе полногеномной последовательности штамма с помощью RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Нуклеотид-

ная последовательность гена *bphA* была преобразована в аминокислотную последовательность, после чего для обеих последовательностей были построены и визуализированы филогенетические деревья в программе MEGA версии 10.0. Множественное выравнивание последовательностей выполняли с помощью CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Для построения белковой структуры были выбраны программы MODELLER версии 10.4 (<https://salilab.org/modeller>), AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) и trRosetta (<https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta/>).

Поиск шаблонов осуществляли с помощью NCBI Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ограничивая зону поиска базами данных Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org>) и UniProt (<https://www.uniprot.org/>), применяя для выравнивания SWISSMODEL. Для анализа отбирали белковые последовательности с максимальной идентичностью.

### Определение качества белковой модели

Для визуализации полученных моделей и предварительного анализа использовали программу PyMOL версии 2.5.4 (<https://pymol.org/>). С помощью PyMOL оценивали общее качество моделей и проверяли ключевые структурные элементы.

Для оценки качества структурных моделей применяли программы ERRAT [Colovos, Yeates, 1993], VERIFY 3D [Lüthy et al., 1992], PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>), WHATCHECK (<https://swift.cmbi.umcn.nl/gv/whatcheck/index.html>), ENDscript (<https://endscript.ibcp.fr/EScript/ENDscript/>).

### Выявление области активного центра фермента

Для анализа активного центра фермента использовалась программа Computed Atlas of Surface Topography of proteins (CASTp) [Tian et al., 2018]. CASTp позволяет идентифицировать и характеризовать функционально значимые поверхности и полости белков, включая активные центры. С помощью CASTp были определены размеры и геометрия активного центра VphA1, а также ключевые аминокислоты, участвующие в каталитическом процессе.

## Результаты и их обсуждение

### Анализ нуклеотидной последовательности гена *bphA*

Нуклеотидная последовательность гена *bphA* (GenBank MW070532), кодирующая  $\alpha$ -субъединицу бифенил диоксигеназы (VphA1), выявлена при анализе генома штамма *R. wratislaviensis* CH628 в системе RAST. Анализ нуклеотидной последовательности *bphA*<sub>CH628</sub> выявил высокий уровень сходства с нуклеотидной последовательностью гена *narA*, кодирующей  $\alpha$ -субъединицу нафталин диоксигеназы (NarA) (рис. 1). На рисунке 1 визуализированы эволюционные связи гена *bphA*<sub>CH628</sub> с нуклеотидными последовательностями, уровень сходства с которыми находится в пределах 91,8–100%. В одной «ветке» с исследуемым геном располагаются гены нафталин диоксигеназ штаммов-деструкторов ароматических соединений, выделенных из района солеотвала горнодобывающего предприятия, очистных сооружений и из почв химического завода [Na et al., 2005; Ananina et al., 2011; Anokhina et al., 2020]. Следует отметить, что такое расположение генов свидетельствует о их высоком сходстве, несмотря на то что данные штаммы выделены с территорий, удаленных друг от друга. Можно предположить, что основным фактором селекции в данном случае выступало химическое загрязнение, а не географическое положение местобитания бактерий.

### Анализ первичной структуры VphA1

В результате дедуктивной трансляции с использованием алгоритмов программы MEGA X и сравнения с гомологичными аминокислотными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что уровень сходства VphA1<sub>CH628</sub> с первичной структурой  $\alpha$ -субъединицы нафталин диоксигеназы (КФ 1.14.12.12) штамма-деструктора *R. oracus* B4 (GenBank VAH47212.1) и  $\alpha$ -субъединицы нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A) составляет 98,6 и 93,7% соответственно. Визуализация математической модели между исследуемой аминокислотной последовательностью и известными показала, что VphA1<sub>CH628</sub> располагается в «ветви» нафталиновых диоксигеназ (рис. 2). При построении филогенетического дерева брали в расчет последовательности, уровень сходства между которыми составлял от 36 до 98%.

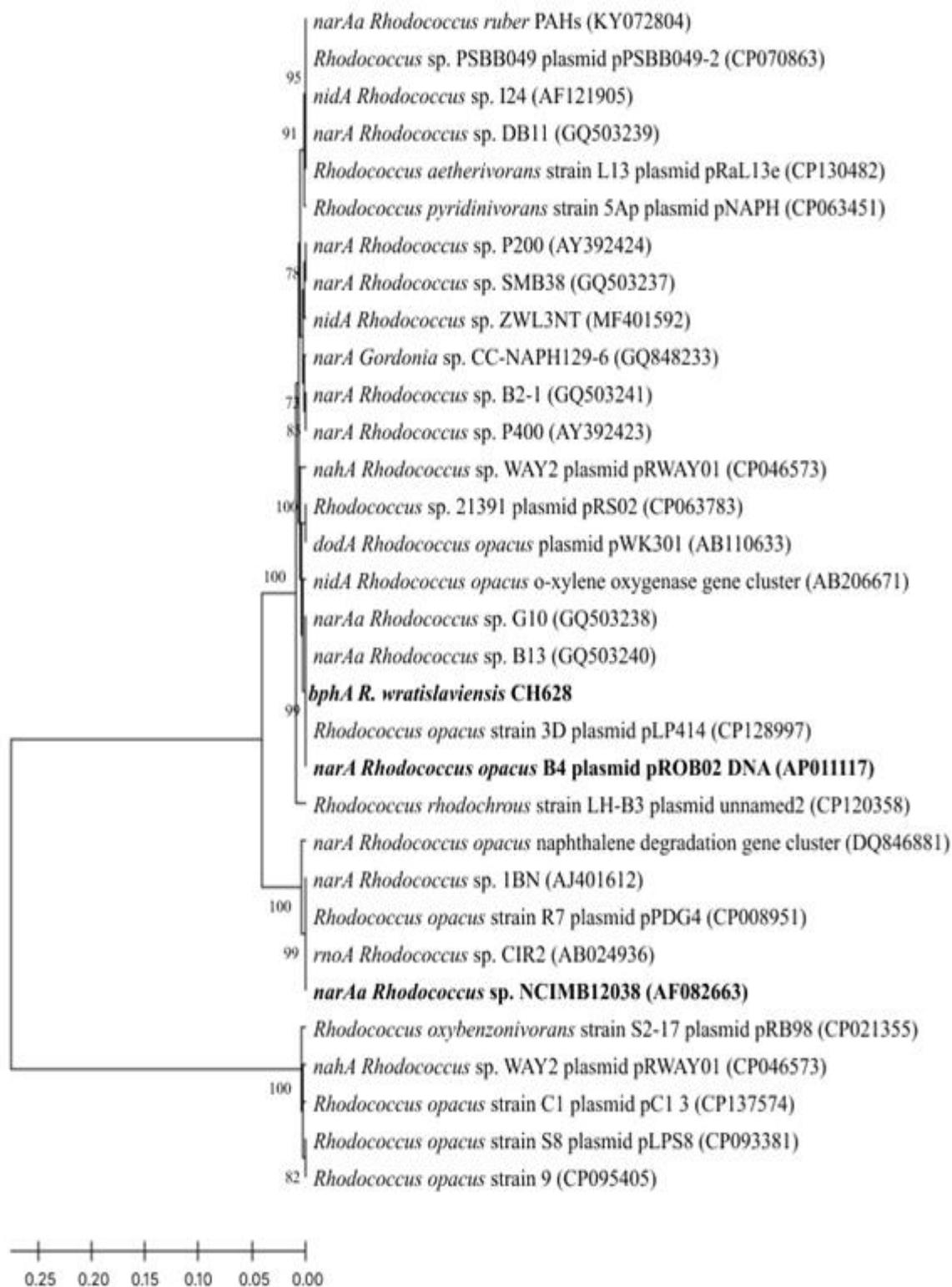


Рис. 1. Положение гена *bphA* *R. wratislaviensis* CH628 на филогенетическом дереве, построенного на основании анализа нуклеотидных последовательностей с использованием метода UPGMA.

Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “butstrap”-анализа

[Position of the *bphA* gene of *R. wratislaviensis* CH628 on the phylogenetic tree constructed based on the analysis of nucleotide sequences using the UPGMA method.

The numbers show the reliability of branching established using the bootstrap analysis]

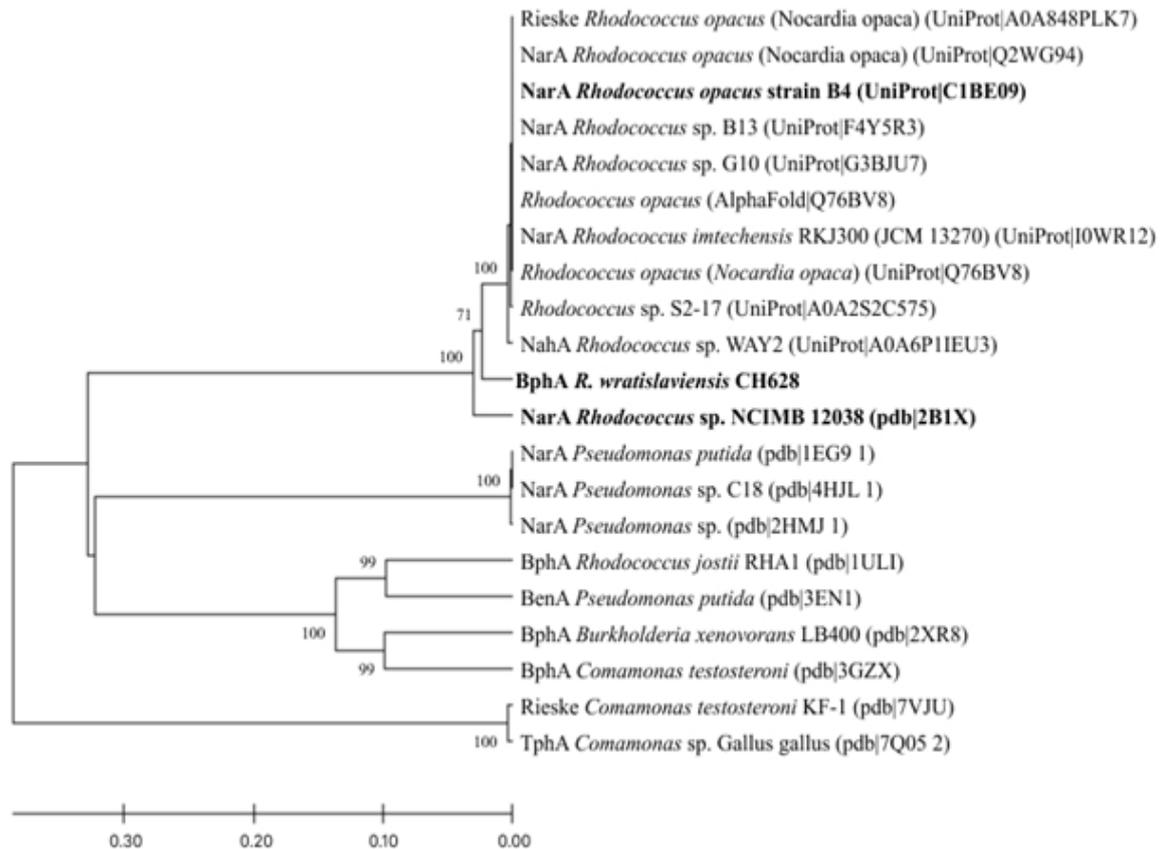


Рис. 2. Положение BphA1 штамма *R. wratislaviensis* CH628 на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей с использованием метода UPGMA.

Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “butstrap”-анализа

[Position of BphA1 of the *R. wratislaviensis* CH628 strain on the phylogenetic tree constructed based on the comparative analysis of amino acid sequences using the UPGMA method.

The numbers show the reliability of branching established using the bootstrap analysis]

### Моделирование вторичной и третичной структуры BphA1

Вторичная структура  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы (BphA1) штамма *R. wratislaviensis* CH628 была получена с использованием программ MODELLER, AlphaFold и trRosetta, отличающихся алгоритмами построения белковой структуры.

В основе моделирования вторичной и третичной структуры белков в программе MODELLER лежит принцип построения по известной модели белка, характеризующейся наибольшим уровнем сходства первичной структуры с аминокислотной последовательностью исследуемого белка/фермента. В рамках настоящего исследования в качестве модели была выбрана классическая структура NarA1, описанная у штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A), которая показала высокий уровень сходства с анализируемой последовательностью (идентичность 93.72% для аминокислотной последовательности). В результате использования алгоритмов программы MODELLER на основе NarA1<sub>NCIMB12038</sub> было построено пять моделей BphA1 штамма *R. wratislaviensis* CH628, отличающихся по показателю энергии. Для дальнейшего исследования была выбрана модель BphA1<sub>CH628</sub> с наименьшим показателем DOPE (-45531.87).

Построение моделей белков без шаблона возможно при использовании программ AlphaFold и trRosetta. Однако данные программы используют различные подходы для прогнозирования новой структуры. В AlphaFold используются алгоритмы мономерной модели, тогда как в trRosetta используются нейронные сети глубокого обучения и алгоритм Rosetta. Использование данных программных комплексов позволило получить две модели BphA1<sub>CH628</sub>. Параметры вторичной структуры  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы штамма *R. wratislaviensis* CH628 представлены в табл. 1. Для удобства описания модели BphA1, полученные с применением различных программ обозначены как:

BphA1(M) – построена в программе MODELLER,

VphA1(AF) – разработана с применением AlphaFold,  
 VphA1(TR) – смоделирована с использованием базовых параметров trRosetta.

Таблица 1

**Характеристики вторичной и третичной структуры VphA1<sub>CH628</sub>**  
**[Characteristics of the secondary and tertiary structure of VphA1<sub>CH628</sub>]**

Элемент структуры	VphA1(M)	VphA1(AF)	VphA1(TR)
$\alpha$ спирали	11	13	13
$\pi$ -спирали	5	5	6
строгие $\alpha$ -витки	2	3	3
$\beta$ складчатости	20	20	17
Строгие $\beta$ -витки	10	10	12
Объём $\text{\AA}^3$	49,40	50,41	48,60
Площадь $\text{\AA}^2$	18,66	19,26	21,01
Количество АК	401	401	401

Использование алгоритма построения «по шаблону» (MODELLER) привело к созданию модели VphA1(M), отличающейся меньшим количеством  $\alpha$  спиралей и наименьшей площадью молекулы, тогда как объем характеризуется средним значением между показателями объема для VphA1(AF) и VphA1(TR). Модель VphA1(TR) обладает наименьшим объемом при наибольшей площади молекулы, содержит большее количество  $\pi$ -спиралей и строгих  $\beta$ -витков.

3D-Модели VphA1<sub>CH628</sub> были визуализированы и предварительно проанализированы с использованием программы PyMOL (рис. 3а–в). Для наглядного сравнения 3D-модели VphA1(M), VphA1(AF) и VphA1(TR) были выровнены относительно друг друга (рис. 3г), что позволило оценить различия в структурных элементах.

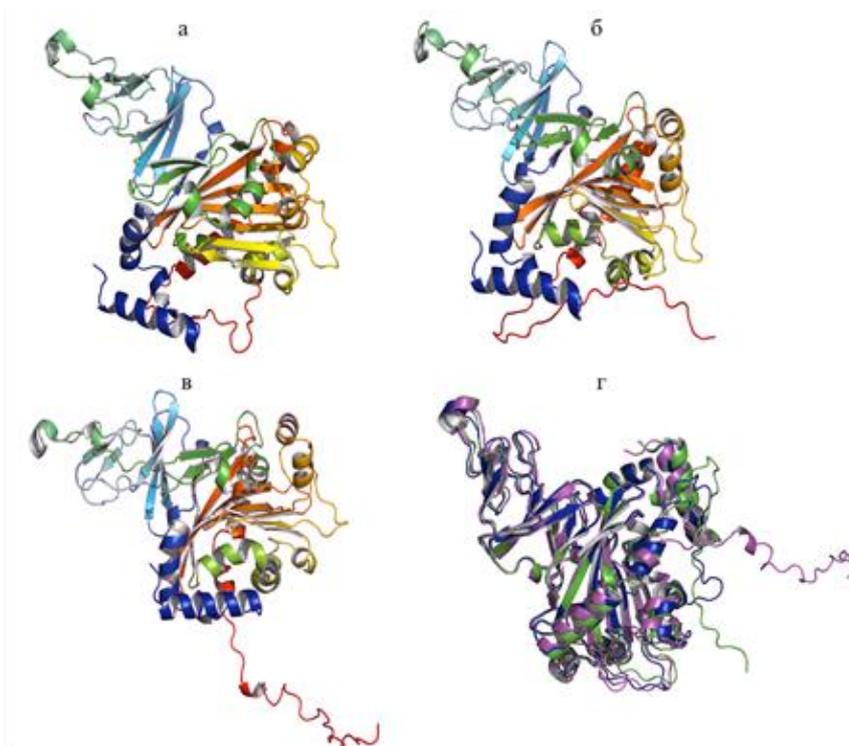


Рис. 3. 3D-Модель VphA1<sub>CH628</sub>: а – VphA1(M), б – VphA1(AF), в – VphA1(TR), г – выровненные относительно друг друга модели VphA1(M) (синий), VphA1(AF) (зелёный) и VphA1(TR) (розовый)  
 [3D-Model of VphA1<sub>CH628</sub>: a – VphA1(M), b – VphA1(AF), c – VphA1(TR), d – aligned relative to each other models of VphA1(M) (blue), VphA1(AF) (green) and VphA1(TR) (pink)]

Из рисунка 3г видно, что петлевые области VphA1<sub>CH628</sub>, особенно на периферии, имеют заметные различия между моделями. Модель VphA1(TR) демонстрирует больше отклонений от структуры VphA1(M) и VphA1(AF) в вытянутых петлях. По всей видимости, trRosetta с меньшей точностью моделирует гибкие области белка, чем MODELLER и AlphaFold. Можно предположить, что VphA1(TR) характеризуется

менее стабильной структурой, т. к. содержит менее компактные петлевые области. Данное предположение подтвердилось при оценке качества моделей.

Качество полученных моделей VphA1<sub>CH628</sub> оценивали с использованием нескольких независимых методов анализа структурных моделей, включая ERRAT, VERIFY3D и PROCHECK (табл. 2, рис. 4).

Таблица 2

**Сравнение параметров качества полученных моделей белка**  
[Comparison of the quality parameters of the obtained protein models]

Модель	ERRAT, %	VERIFY 3D, %	PROCHECK
			График Рамачандрана
VphA1(M)	87.53	96.01	Остатки в регионах с наибольшим благоприятствованием 90.7% (304)
			Остатки в дополнительных разрешенных регионах 8.7% (29)
			Остатки в широко разрешенных областях 0.3% (1)
			Остатки в запрещенных областях 0.3% (1)
			8 маркированных остатков (из 399)
VphA1(AF)	90.84	82.79	Остатки в регионах с наибольшим благоприятствованием 86.3% (289)
			Остатки в дополнительных разрешенных регионах 13.1% (44)
			Остатки в широко разрешенных областях 0.6% (2)
			Остатки в запрещенных областях 0.0% (0)
			7 маркированных остатков (из 399)
VphA1(TR)	89.92	71.82	Остатки в регионах с наибольшим благоприятствованием 91.0% (305)
			Остатки в дополнительных разрешенных регионах 8.1% (27)
			Остатки в широко разрешенных областях 0.6% (2)
			Остатки в запрещенных областях 0.3% (1)
			3 маркированных остатка (из 399)

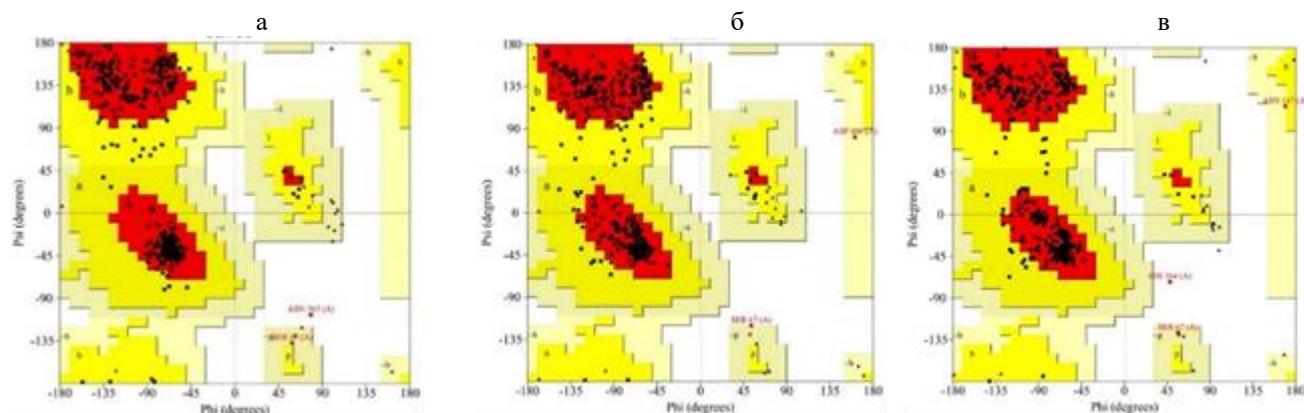


Рис. 4. График Рамачандрана модели VphA1<sub>CH628</sub>, построенный с использованием (а) Modeller10.4, (б) AlphaFold, (в) TrRosetta

[Ramachandran plot of VphA1<sub>CH628</sub> model built using (a) Modeller10.4, (б) AlphaFold, (в) TrRosetta]

VphA1(M) показала наивысшую точность: 90.7% аминокислотных остатков находились в благоприятных регионах графика Рамачандрана, а ERRAT-показатель составил 87.53%. VphA1(AF) продемонстрировала высокую точность в предсказании активного центра фермента, хотя её общие показатели ERRAT (90.8%) и VERIFY3D (82.79%) были чуть ниже по сравнению с VphA1(M). Модель VphA1<sub>CH628</sub>, созданная с помощью trRosetta, оказалась наименее точной, так как ее показатель VERIFY3D составил 71.82%. Таким образом, VphA1(M) характеризуется наиболее точной структурой.

Построенные модели служат основой для дальнейшего структурного и функционального анализа, позволяя сравнить VphA1 с другими диоксигеназами и выявить уникальные или консервативные структурные особенности.

В рамках настоящего исследования было осуществлено сравнение модели VphA1<sub>CH628</sub>, полученной с использованием MODELLER с моделями  $\alpha$ -субъединиц известных штаммов-деструкторов ароматических соединений. Анализ показал, что VphA1<sub>CH628</sub> структурно ближе к  $\alpha$ -субъединице нафталин диокси-

геназы штаммов *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 и *Rhodococcus opacus* B4. Для сравниваемых аминокислотных последовательностей характерны длинные области с одинаковым набором аминокислот. Сравнение количественных показателей вторичной структуры VphA1<sub>CH628</sub> с NаrA<sub>NCIMB12038</sub> и NаrA<sub>B4</sub> выявило различие в одну  $\alpha$ -спираль, 2-3  $\eta$ -спирали, и одну  $\beta$ -складчатость.

Принципиально другую картину мы получили при сравнении VphA1<sub>CH628</sub> с  $\alpha$ -субъединицей бифенил диоксигеназы штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 (рис. 4б). Выявлено, что при незначительных отличиях в количественных показателях расположение спиралей и складчатостей практически не совпадало.

Полученные результаты позволяют предположить, что бифенил диоксигеназа штамма *R. wratislaviensis* CH628 способна катализировать реакции, характерные для нафталиновых диоксигеназ.

#### Анализ активного центра VphA1 штамма *R. wratislaviensis* CH628

Анализ активного центра фермента VphA1<sub>CH628</sub> был выполнен с использованием программы CASTp. Установлено, что модель VphA1(AF), созданная в программе AlphaFold, наиболее точно предсказала расположение активного центра (рис. 5).

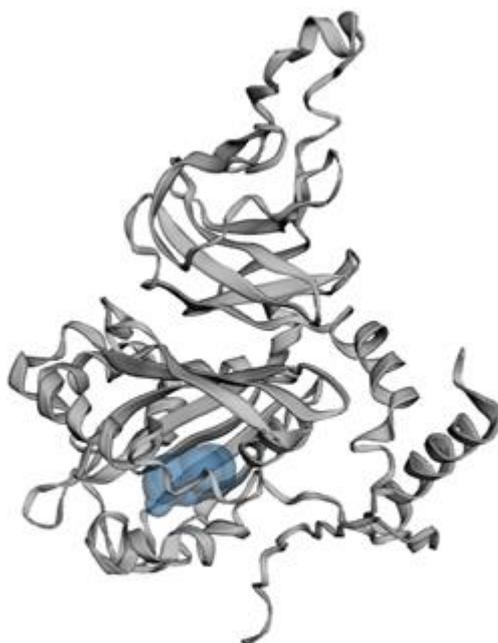


Рис. 5. Модель VphA1 *R. wratislaviensis* CH628, полученная при помощи системы искусственного интеллекта AlphaFold. Синим цветом выделена предполагаемая область активного центра [Model of VphA1 of *R. wratislaviensis* CH628 obtained using the AlphaFold artificial intelligence system. The putative active site region is highlighted in blue]

На основании полученных данных можно предположить, что субстрат-связывающий карман в каталитическом домене  $\alpha$ -субъединицы VphA1<sub>CH628</sub> формируют спирали  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\beta$ -нити  $\beta 15$ ,  $\beta 16$ ,  $\beta 17$ , петли  $\alpha 10$ – $\alpha 11$  и  $\beta 14$ . В активном центре находятся аминокислоты Asn209, Phe210, Asp213, Ala214, His216, Thr217, His221, Met 224, Ala230, Phe236, Ala237, Ile254, Phe293, His295, Phe307, Met309, Thr361, Leu362, Ala369. Следует отметить, что аминокислоты His216 и His221 также присутствуют в составе активного центра нафталин диоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (PDB ID: 2B1X|A) и участвуют во взаимодействии с ионом Fe<sup>3+</sup>.

У штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 карман связывания субстрата расположен между основным  $\beta$ -слоем и  $\alpha$ -спиралями в каталитическом домене  $\alpha$ -субъединицы бифенил диоксигеназы и формируется спиралями  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta$ -нитью 16, петлями  $\alpha 13$ – $\alpha 14$  и  $\beta 17$ – $\beta 18$ , включая остатки вокруг иона Fe<sup>3+</sup> (Gln217, Phe218, His224, His230 и Asp378). В кармане связывания субстрата два кольца связанной молекулы бифенила расположены не параллельно, а со смещением. Каждое кольцо субстрата зафиксировано с обеих сторон; кольцо 1 располагается между His224 и Leu323, а кольцо 2 – между Ala225 и Phe368 [Fugusawa et al., 2004].

Сравнение активных центров VphA1<sub>CH628</sub> и VphA1<sub>RHA1</sub> показало, что аминокислоты Ala225 и Leu323, взаимодействующие с молекулой бифенила в активном центре штамма *R. jostii* RHA1 и находящиеся в таких же позициях Val225 и Leu323 штамма *R. wratislaviensis* CH628 (рис. 4б) относятся к группе

нейтральных гидрофобных аминокислот, что может обеспечивать взаимодействие активного центра BphA1<sub>CH628</sub> с молекулой бифенила. Одной из аминокислот, участвующих во взаимодействии с ионом Fe<sup>3+</sup>, в BphA1<sub>RHA1</sub> является Gln217. В данной позиции в составе BphA1<sub>CH628</sub> находится Thr217 (рис. 46). Поскольку данные аминокислоты принадлежат группе полярных гидрофильных аминокислот, можно предположить, что Thr217 активного центра BphA1<sub>CH628</sub> также участвует во взаимодействии с ионом Fe<sup>3+</sup>.

Сходство ряда ключевых аминокислотных остатков активного центра BphA1<sub>CH628</sub>, NarA<sub>NCIMB12038</sub> и BphA1<sub>RHA1</sub> позволяет предположить, что бифенил диоксигеназа штамма *R. wratislaviensis* CH628 способна эффективно катализировать диоксигеназные реакции, необходимые для разложения как нафталина/полициклических ароматических углеводородов, так и полихлорированных бифенилов.

## Заключение

В ходе данного исследования были созданы и проанализированы три модели бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) штамма *R. wratislaviensis* CH628 с использованием программ MODELLER, AlphaFold и trRosetta. Каждая из моделей прошла тщательную оценку качества с помощью таких инструментов, как ERRAT, VERIFY3D и PROCHECK. Наиболее высокие показатели точности структуры продемонстрировала модель, созданная с помощью MODELLER, где более 90% аминокислотных остатков находятся в благоприятных регионах, что делает её наиболее достоверной для общего структурного анализа. Однако модель AlphaFold показала наибольшую точность в предсказании активного центра фермента.

Анализ активного центра показал значительное сходство между BphA1 штамма *R. wratislaviensis* CH628 и нафталин диоксигеназой (NarA1) штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038. Большинство консервативных аминокислотных остатков, таких как His216 и His221, которые участвуют во взаимодействии с субстратами и ионами металлов, присутствуют в обеих последовательностях. Также выявлены сходства в строении субстрат-связывающего каталитического кармана BphA1<sub>CH628</sub> и BphA1<sub>RHA1</sub> и некоторых ключевых аминокислотных остатков активного центра.

Таким образом, модель BphA1<sub>CH628</sub>, построенная с помощью AlphaFold, наиболее пригодна для дальнейших исследований, связанных с функциональным анализом активного центра фермента, в то время как модель BphA1<sub>CH628</sub>, созданная в программе MODELLER, рекомендуется для общего структурного анализа и понимания стабильности белка. Полученные данные открывают перспективы для дальнейшего структурного и биохимического изучения бифенил диоксигеназы штамма *R. wratislaviensis* CH628.

## Список источников

1. Ananina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011. Vol. 100. P. 309–316. doi: 10.1007/s10482-011-9580-3. EDN: OHZMXD
2. Anokhina T.O. et al. Alternative naphthalene metabolic pathway includes formation of ortho-phthalic acid and cinnamic acid derivatives in the *Rhodococcus opacus* strain 3D // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. Vol. 85. P. 355–368. doi: 10.1134/S0006297920030116. EDN: MHPAVJ
3. Baratto M.C. et al. Spectroscopic characterisation of the naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038 // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20, № 14. Art. 3402. doi: 10.3390/ijms20143402.
4. Castro A.R. et al. *Rhodococcus opacus* B4: a promising bacterium for production of biofuels and biobased chemicals // *AMB Express*. 2016. Vol. 6. P. 1–11. doi: 10.1186/s13568-016-0207-y. EDN: GZKDLZ
5. Colbert C.L. et al. Structural characterization of *Pandoraea pnomenus* B-356 biphenyl dioxygenase reveals features of potent polychlorinated biphenyl-degrading enzymes // *PLoS One*. 2013 Vol. 8, № 1. Art. e52550. doi: 10.1371/journal.pone.0052550.
6. Colovos C, Yeates T.O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions // *Protein Science*. 1993. Vol. 2, № 9. P. 1511–1519. doi: 10.1002/pro.5560020916.
7. Dhindwal S. et al. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase // *Journal of Bacteriology*. 2016. Vol. 198, № 10. P. 1499–1512. doi: 10.1128/jb.00952-15.
8. Egorova D.O. et al. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new *Rhodococcus wratislaviensis* strain Ch628 // *Water Air Soil Pollution*. 2017. Vol. 228. P. 183–199. doi: 10.1007/s11270-017-3344-2. EDN: YVIWTP
9. Egorova, D.O. et al. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus*-strains // *Journal of Hazardous Materials*. 2020. Vol. 400. Art. 123328. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123328. EDN: YAMJTU
10. Furusawa Y. et al. Crystal Structure of the Terminal Oxygenase Component of Biphenyl Dioxygenase Derived from *Rhodococcus* sp. Strain RHA1 // *Journal of Molecular Biology*. 2004. Vol. 342, № 3. P. 1041–1052. doi: 10.1016/j.jmb.2004.07.062. EDN: KFOYKL

11. Gorbunova T.I. et al. Degradability of commercial mixtures of polychlorobiphenyls by three *Rhodococcus* strains // *Archives of Microbiology*. 2022. Vol. 204. Art. 534. doi: 10.1007/s00203-022-03131-1.
12. Gorbunova, T.I. et al. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus* strains // *Journal of Hazardous Materials*. 2021. Vol. 409. Art. 124471. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124471. EDN: QHUUIH
13. Jones D.T. et al. MetaPSICOV: combining coevolution methods for accurate prediction of contacts and long range hydrogen bonding in proteins // *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31, № 7. P. 999–1006. doi: 10.1093/bioinformatics/btu791.
14. Kuhlman B., Bradley P. Advances in protein structure prediction and design // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20, № 11. P. 681–697. doi: 10.1038/s41580-019-0163-x. EDN: IJAOHN
15. Lüthy R., Bowie J.U. Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles // *Nature*. 1992. Vol. 356, № 6364. P. 83–85. doi: 10.1038/356083a0.
16. Na K.S. et al. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005. Vol. 99, № 4. P. 378–382. doi: 10.1263/jbb.99.378.
17. Tian W. et al. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins // *Nucleic Acids Research*. 2018. Vol. 4, № W1. P. W363–W367. doi: 10.1093/nar/gky473.
18. Wang S. et al. Accurate de novo prediction of protein contact map by ultra-deep learning model // *PLoS Computational Biology*. 2017. Vol. 13, № 1. Art. e1005324. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005324.
19. Wang Y et al. The engineered biphenyl dioxygenases enhanced the metabolism of dibenzofuran // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2021. Vol. 161. Art. 105228. doi: 10.1016/j.ibiod.2021.105228. EDN: BVRXVY
20. Zhu L. et al. Degradation mechanism of biphenyl and 4,4'-dichlorobiphenyl cis-dihydroxylation by non-heme 2,3 dioxygenases BphA: A QM/MM approach // *Chemosphere*. 2020. Vol. 247. Art. 125844. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.125844. EDN: UMRTTC

## References

1. Anan'ina L.N. et al. Naphthalene-degrading bacteria of the genus *Rhodococcus* from the Verkhnekamsk salt mining region of Russia. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 100 (2011): pp. 309-316. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9580-3>.
2. Anokhina T.O. et al. Alternative naphthalene metabolic pathway includes formation of ortho-phthalic acid and cinnamic acid derivatives in the *Rhodococcus opacus* strain 3D. *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 85 (2020): pp. 355-368. <https://doi.org/10.1134/S0006297920030116>.
3. Baratto M.C. et al. Spectroscopic characterisation of the naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 20, No. 14 (2019): Art. 3402. <https://doi.org/10.3390/ijms20143402>.
4. Castro A.R. et al. *Rhodococcus opacus* B4: a promising bacterium for production of biofuels and biobased chemicals. *AMB Express*. Vol. 6 (2016): pp. 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0207-y>.
5. Colbert C.L. et al. Structural characterization of *Pandoraea promenua* B-356 biphenyl dioxygenase reveals features of potent polychlorinated biphenyl-degrading enzymes. *PLoS One*. Vol. 8, No. 1 (2013): Art. e52550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052550>.
6. Colovos C., Yeates T.O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*. Vol. 2, No. 9 (1993): pp. 1511-1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.
7. Dhindwal S. et al. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase. *Journal of Bacteriology*. Vol. 198, No. 10 (2016): pp. 1499-1512. <https://doi.org/10.1128/jb.00952-15>.
8. Egorova D.O. et al. Biodegradability of hydroxylated derivatives of commercial polychlorobiphenyls mixtures by *Rhodococcus* strains. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 400 (2020): Art. 123328. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123328>.
9. Egorova D.O. et al. Bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil by the new *Rhodococcus wratislaviensis* strain Ch628. *Water Air Soil Pollution*. Vol. 228 (2017): pp. 183-199. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3344-2>.
10. Furusawa Y. et al. Crystal Structure of the Terminal Oxygenase Component of Biphenyl Dioxygenase Derived from *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 342, No. 3 (2004): pp. 1041-1052. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.062>.
11. Gorbunova T.I. et al. Biodegradation of trichlorobiphenyls and their hydroxylated derivatives by *Rhodococcus* strains. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 409 (2021): Art. 124471. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124471>.
12. Gorbunova T.I. et al. Degradability of commercial mixtures of polychlorobiphenyls by three *Rhodococcus* strains. *Archives of Microbiology*. Vol. 204 (2022): Art. 534. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03131-1>.

13. Jones D.T. et al. MetaPSICOV: combining coevolution methods for accurate prediction of contacts and long-range hydrogen bonding in proteins. *Bioinformatics*. Vol. 31, No. 7 (2015): pp. 999-1006. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu791>.
14. Kuhlman B., Bradley P. Advances in protein structure prediction and design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 20, No 11 (2019): pp. 681-697. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>.
15. Lüthy R., Bowie J.U. Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. Vol. 356, No. 6364 (1992): pp. 83-85. <https://doi.org/10.1038/356083a0>.
16. Na K.S. et al. Isolation and characterization of benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 99. No. 4 (2005): pp. 378-382. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.378>.
17. Tian W. et al. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*. Vol. 46, No. W1 (2018): pp. W363–W367. <https://doi.org/10.1093/nar/gky473>.
18. Wang S. et al. Accurate de novo prediction of protein contact map by ultra-deep learning model. *PLoS Computational Biology*. Vol. 13, No. 1 (2017): Art. e1005324. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005324>.
19. Wang Y. et al. The engineered biphenyl dioxygenases enhanced the metabolism of dibenzofuran. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Vol. 161 (2021): Art. 105228. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105228>.
20. Zhu L. et al. Degradation mechanism of biphenyl and 4,4'-dichlorobiphenyl cis-dihydroxylation by non-heme 2,3 dioxygenases BphA: A QM/MM approach. *Chemosphere*. Vol. 247 (2020): Art. 125844. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125844>.

Статья поступила в редакцию 11.11.2024; одобрена после рецензирования 25.11.2024; принята к публикации 04.03.2025.

The article was submitted 11.11.2024; approved after reviewing 25.11.2024; accepted for publication 04.03.2025.

#### **Информация об авторе**

Т. Д. Кирьянова – инженер.

#### **Information about the author**

T. D. Kir'yanova – engineer.