



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Carolina Wilson

Determinação das estruturas cristalográficas de Epóxido Hidrolases
de interesse biotecnológico e envolvidas na biossíntese de
antibióticos ionóforos

São Paulo
2017

Carolina Wilson

Determinação das estruturas cristalográficas de Epóxido Hidrolases
de interesse biotecnológico e envolvidas na biossíntese de
antibióticos ionóforos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Biologia Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias

São Paulo
2017

Wilson, Carolina.

Determinação das estruturas cristalográficas de epóxido hidrolases de interesse biotecnológico e envolvidas na biossíntese de antibióticos ionóforos / Carolina Wilson. -- São José do Rio Preto, 2017

124 f. : il., tabs.

Orientador: Marcio Vinícius Bertacine Dias

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Antibióticos – Biotecnologia. 3. Epóxido hidrolases. 4. Cristalografia. 5. Produtos naturais. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Carolina Wilson

Determinação das estruturas cristalográficas de Epóxido Hidrolases
de interesse biotecnológico e envolvidas na biossíntese de
antibióticos ionóforos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Gustavo Fernando Mercaldi
LNBIO – Campinas

Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho
USP – São Paulo

Prof. Dr. Robson Francisco de Souza
USP – São Paulo

Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcade
USP – São Paulo

São Paulo
28 de abril de 2017

AGRADECIMENTOS

- Agradeço aos meus familiares e amigos pelo apoio incondicional em todas as etapas até aqui concluídas;
- Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias, pela oportunidade de poder trabalhar em seu laboratório e por proporcionar todas as ferramentas necessárias à realização deste projeto de pesquisa. Agradeço também à sua paciência, competência, ética e profissionalismo em orientar;
- Agradeço ao Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcade (USP), à Prof^a. Dr^a. Luciana Gonzaga de Oliveira (UNICAMP) e ao Prof. Dr. Peter Leadlay (University of Cambridge) pelas colaborações e parcerias indispensáveis para a realização deste trabalho, pela enriquecedora troca de conhecimentos, “plasmídeos” e proteínas;
- Agradeço à CAPES por todo o apoio financeiro;
- Agradeço aos meus colegas do LBEA pelas experiências profissionais compartilhadas e pelos momentos de amizade e descontração.

“Who gets to determine when the old ends and the new begins? It’s not on the calendar, it’s not a birthday, it’s not a new year, it’s an event – big or small, something that changes us, ideally it gives us hope, a new way of living and looking the world, letting go of old habits, old memories. What’s important is that we never stop believing we can have a new beginning (...).”

Franz Kafka

Resumo

As epóxido hidrolases (EHs) são enzimas que catalisam a conversão de epóxidos em dióis vicinais. Esses compostos são menos reativos, menos mutagênicos, menos tóxicos e são excretados mais rapidamente das células pois apresentam maior solubilidade. Nas reações de catálise, as EHs utilizam a água como o único co-substrato, o que é uma característica particular desta classe enzimática. Em microorganismos, elas atuam na adaptação ao meio ambiente, metabolizando fontes naturais de carbono e contaminantes. Em patógenos, como *M. tuberculosis*, atuam na virulência e desintoxicação. Além disso, têm importantes aplicações industriais, farmacêuticas e agroquímicas, como a degradação de xenobióticos, separação enantiomérica de misturas de epóxidos, hidrólise regio e enantiosseletiva de epóxidos quirais e biossíntese de antibióticos poliéteres ionóforos. Os objetivos do presente trabalho são a cristalização e resolução estrutural das epóxido hidrolases B1EPH2 de *Streptomyces wadayamensis* e TrEH de *Trichoderma reesei*, que apresentam interesse biotecnológico devido a propriedades enantiosseletivas e do mutante Lsd19 E197D (*S. lasaliensis*) e TsnB (*S. longisporoflavus*), envolvidas na biossíntese dos antibióticos poliéteres ionóforos lasalocida e tetronasina, respectivamente. Estas enzimas foram co-cristalizadas com diferentes epóxidos, inibidores, substratos e análogos de substrato e as estruturas foram resolvidas por substituição molecular. A B1EPH2 e TrEH apresentaram enovelamento similar às α/β -Hidrolases, com dois domínios distintos, o domínio catalítico conservado ou N-terminal e o domínio cap ou C-terminal. As estruturas de Lsd19 E197D e TsnB apresentaram enovelamento característico das Limoneno Epóxido Hidrolases, com dois domínios – N-terminal e C-terminal – semelhantes entre si e formados por uma β -folha e α -hélices dispostas de forma semelhante a um cone. Além disso, as enzimas do presente estudo foram comparadas a outras EHs com estruturas já resolvidas no que se refere à presença de resíduos conservados nos sítos ativos. Dessa forma, levantamos algumas hipóteses a respeito de mecanismo catalítico das EHs estudadas.

Palavras-chave: epóxido hidrolases, enantiosseletividade, poliéteres ionóforos, produtos naturais, cristalografia.

Abstract

Epoxide hydrolases (EHs) are enzymes that catalyze the conversion of epoxides to vicinal diols. These compounds are less reactive, less mutagenic, less toxic and are excreted more rapidly from the cells because they have greater solubility. In the catalysis reactions, the EHs use water as the only co-substrate, which is a particular characteristic of this enzymatic class. In microorganisms, they act in the adaptation to the environment, metabolizing natural sources of carbon and contaminants. In pathogens, such as *M. tuberculosis*, they act on virulence and detoxification. In addition, they have important industrial, pharmaceutical and agrochemical applications, such as degradation of xenobiotics, enantiomeric separation of epoxide mixtures, regio and enantioselective hydrolysis of chiral epoxides and biosynthesis of ionophores polyethers antibiotics. The objectives of the present work are the crystallization and structural resolution of the epoxide hydrolases B1EPH2 from *Streptomyces wadayamensis* and TrEH from *Trichoderma reesei*, which show biotechnological interest due to enantioselective properties and the mutant Lsd19 E197D (*S. lasaliensis*) and TsnB (*S. longisporoflavus*), involved in the biosynthesis of the ionophores antibiotics lasalocid and tetronasin, respectively. These enzymes were co-crystallized with different epoxides, inhibitors, substrates and substrate analogues and the structures were resolved by molecular substitution. B1EPH2 and TrEH showed similar folding to α/β -hydrolases, with two distinct domains, the conserved or N-terminal catalytic domain and the cap or C-terminal domain. The structures of Lsd19 E197D and TsnB presented a characteristic folding of Limonene Epoxide Hydrolases, with two domains – N-terminal and C-terminal – similar to each other and formed by a β -sheet and α -helices arranged similarly to a cone. In addition, the enzymes of the present study were compared to other EHs with structures already resolved with respect to the presence of residues conserved in the active sites. Thus, we raise some hypotheses about the catalytic mechanism of the EHs studied.

Keywords: epoxide hydrolases, enantioselectivity, ionophores polyethers, natural products, crystallography.

Lista de Figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1 Exemplos de reações regiosseletivas de abertura de anéis oxirano em etanol ácido.....	16
Figura 2 Mecanismo geral da hidrólise enzimática de epóxidos.....	17
Figura 3 Exemplos de antibióticos poliéteres ionóforos.....	20
Figura 4 Exemplos de reações enantiosseletivas realizadas por epóxido hidrolases.....	25
Figura 5 Visão geral da estrutura secundária da Mtb EH.....	28
Figura 6 Resíduos do sítio ativo da Mtb EH.....	29
Figura 7 Mecanismo catalítico das α/β -hidrolases representado a partir da EH de <i>M. Tuberculosis</i>	30
Figura 8 Limoneno Epóxido Hidrolase de <i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14....	33
Figura 9 Visão geral do fold da estrutura da Lsd19.....	34
Figura 10 Sítio ativo da Lsd19.....	35
Figura 11 Representação do mecanismo de formação de éteres cíclicos no processo de síntese da lasalocida A.....	38
Figura 12 Esquema representando os diferentes métodos de cristalização por difusão de vapor.....	48
Figura 13 Cromatografia de Afinidade da B1EPH2.....	51
Figura 14 Cromatografia de Gel Filtração Analítica da B1EPH2.....	53
Figura 15 Cristalização e Difração de Raios-X da B1EPH2.....	54
Figura 16 Estrutura quaternária da B1EPH2.....	56
Figura 17 Estrutura tridimensional da B1EPH2.....	57
Figura 18 Superfície eletrostática da B1EPH2.....	58
Figura 19 Resíduos do sítio ativo da B1EPH2.....	60
Figura 20 Estrutura da B1EPH2 sobreposta à sEH humana.....	62
Figura 21 Sobreposição de resíduos do sítio ativo de diferentes EHs.....	63
Figura 22 SDS-PAGE da cromatografia de afinidade da TrEH.....	65

Figura 23	Cromatografia de Gel Filtração Analítica da TrEH.....	66
Figura 24	Cristalização e Difração de Raios-X da TrEH.....	67
Figura 25	Interface de dimerização em diferentes sEH.....	69
Figura 26	Estrutura tridimensional da TrEH.....	70
Figura 27	Superfície eletrostática da TrEH.....	71
Figura 28	Resíduos do sítio ativo da TrEH.....	72
Figura 29	Mapa de densidade eletrônica do sítio ativo da TrEH.....	74
Figura 30	Estrutura da TrEH sobreposta à sEH humana.....	76
Figura 31	Sobreposição de resíduos do sítio ativo de diferentes EHs.....	77
Figura 32	Cavidades catalíticas de diferentes sEH.....	79
Figura 33	Alinhamento das sequências de epóxido hidrolases clássicas.....	81
Figura 34	Sobreposição das estruturas da B1EPH2 e TrEH.....	82
Figura 35	Sobreposição dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da B1EPH2 e TrEH.....	83
Figura 36	Cromatografia de Afinidade da Lsd19 E197D.....	85
Figura 37	Cromatografia de Gel Filtração da Lsd19 E197D.....	86
Figura 38	Cristalização e Difração de Raios-X da Lsd19 E197D.....	88
Figura 39	Estrutura cristalográfica da Lsd19 E197D.....	90
Figura 40	Superfície eletrostática da Lsd19 E197D.....	91
Figura 41	Sobreposição dos resíduos do sítio ativo da Lsd19 selvagem e do mutante E197D.....	92
Figura 42	Cromatografia de Afinidade da TsnB.....	93
Figura 43	Cromatografia de Gel Filtração da TsnB.....	94
Figura 44	Cristalização e Difração de Raios-X da TsnB.....	95
Figura 45	Estrutura Cristalográfica da TsnB.....	97
Figura 46	Superfície eletrostática da TsnB e TmnB.....	98
Figura 47	Resíduos do sítio ativo da TsnB e TmnB.....	100
Figura 48	Sobreposição dos resíduos hidrofóbicos dos sítios ativos da TsnB e TmnB.....	101
Figura 49	Cavidades catalíticas da TsnB e TmnB.....	102

Lista de Tabelas

	<u>Pág.</u>
Tabela 1 Tampões utilizados nas etapas de purificação.....	47
Tabela 2 Condições de cristalização da B1EPH2.....	54
Tabela 3 Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da B1EPH2.....	55
Tabela 4 Condições de cristalização da TrEH.....	66
Tabela 5 Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da TrEH.....	68
Tabela 6 Diferentes mutações da Lsd19 e os efeitos na produção da lasalocida <i>in vivo</i>	87
Tabela 7 Condições de cristalização da Lsd19 E197D.....	87
Tabela 8 Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da Lsd19 E197D.	88
Tabela 9 Condições de cristalização da TsnB.....	94
Tabela 10 Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da TsnB.....	96

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGV – Ácido graxo volátil

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosinatrifosfato

B1EPH2 – Epóxido hidrolase de *Streptomyces wadayamensis*

eDNA – *Enviromental deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico Ambiental)

ee – Excesso enantiomérico

EH – Epóxido hidrolase

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida da proteína rápida)

HEPES – Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

kDa – Quilodaltons

LB – *Lysogeny Broth*

LEH – Limoneno epóxido hidrolase

Lsd19 – Epóxido hidrolase selvagem de *Streptomyces lasaliensis*

Lsd19 E197D – Epóxido hidrolase mutante de *Streptomyces lasaliensis*

mAU – *Milli Absorption Units* (Unidades de Absorção Mili)

mEH – Epóxido hidrolase microsomal

mg – Miligrama

mM – Milimolar

MOPS – Ácido 3-morfolino propanosulfônico

Mtb EH – Epóxido hidrolase de *Mycobacterium tuberculosis*

nm – Nanômetro

OD₆₀₀ – *Optical Density* (Densidade Ótica)

ORF – *Open Reading Frame* (Matriz Aberta de Leitura)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PDB – *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteínas)

pH – Potencial hidrogeniônico

PKS – *Polyketide Synthase* (Policetídeo Sintase)

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

sEH – Epóxido hidrolase solúvel

sp. – Espécie não definida

TrEH – Epóxido hidrolase de *Trichoderma reesei*

TMN – Tetronomicina

TmnB – Epóxido hidrolase de *Streptomyces* sp. NRRL11266

TSN – Tetronasina

TsnB – Epóxido hidrolase de *Streptomyces longisporoflavus*

K⁺ – Íon potássio

Na⁺ – Íon sódio

α – Alfa

β – Beta

η – Eta

μL – Microlitro

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO.....	15
1) Epóxido Hidrolases.....	15
a) α/β -Hidrolases.....	27
b) Limoneno Epóxido Hidrolases.....	32
II – OBJETIVOS.....	41
III – MÉTODOS.....	42
1) Clonagem e Expressão.....	42
a) Epóxido Hidrolase de <i>Streptomyces wadayamensis</i> – B1EPH2.....	42
b) Epóxido Hidrolase de <i>Trichoderma reesei</i> – TrEH.....	43
c) Mutante E197D de <i>Streptomyces lasaliensis</i> – Lsd19 (Lsd19 E197D).....	44
d) Epóxido Hidrolases de <i>Streptomyces longisporosflavius</i> – TsnB.....	45
2) Purificação.....	46
3) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X.....	47
4) Determinação Estrutural.....	50
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
1) α/β-Hidrolase B1EPH2.....	51
a) Purificação.....	51
b) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X.....	54
c) Determinação Estrutural.....	55
2) α/β-Hidrolase TrEH.....	64
a) Purificação.....	64

b) Ensaio de Cristalização e Difração de Raios-X.....	66
c) Determinação Estrutural.....	68
i) Comparações entre as sEH.....	79
ii) B1EPH2 e TrEH.....	82
3) Limoneno Epóxido Hidrolase Lsd19 E197D.....	84
a) Purificação.....	84
b) Ensaio de Cristalização e Difração de Raios-X.....	86
c) Determinação Estrutural.....	89
4) Limoneno Epóxido Hidrolase TsnB.....	92
a) Purificação.....	92
b) Ensaio de Cristalização e Difração de Raios-X.....	94
c) Determinação Estrutural.....	96
V – CONCLUSÕES.....	103
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
VII – ANEXOS.....	117
ANEXO A – Aminoácidos, símbolos e abreviações.....	117
ANEXO B – Structure of a soluble epoxide hydrolase identified in <i>Trichoderma reesei</i>	118

I – INTRODUÇÃO

1) Epóxido Hidrolases

Epóxidos são éteres cíclicos com um anel de dois carbonos e um oxigênio, também denominado de anel oxirano e sua síntese ocorre a partir de reações de oxidação de hidrocarbonetos alifáticos insaturados. Caracterizam-se por serem eletrófilos muito mais reativos que os demais éteres devido às ligações C – O altamente polarizadas e à tensão do anel (Parker e Isaacs, 1959) e apresentam como nucleófilos reagentes como a água, aminas, tióis e álcoois. As reações de abertura dos anéis oxirano ocorrem sob condições ácidas ou básicas e podem ser estereo ou regiosseletivas, culminando com a formação de um diol vicinal ou glicol, em que dois grupos hidroxila (– OH) estão ligados a dois átomos de carbono adjacentes (Sienel *et al.*, 2014). As reações estereosseletivas levam à formação preferencial de um estereoisômero, moléculas que se diferem na disposição tridimensional dos átomos (Chhabra *et al.*, 2013; Gal, 2013). As reações regiosseletivas formam preferencialmente um dos isômeros constitucionais, com estruturas que diferem na posição de um substituinte, na formação da cadeia ou na localização do grupo funcional apresentando, desse modo, propriedades químicas e físicas distintas (Mcconathy e Owens, 2003) (Figura 1).

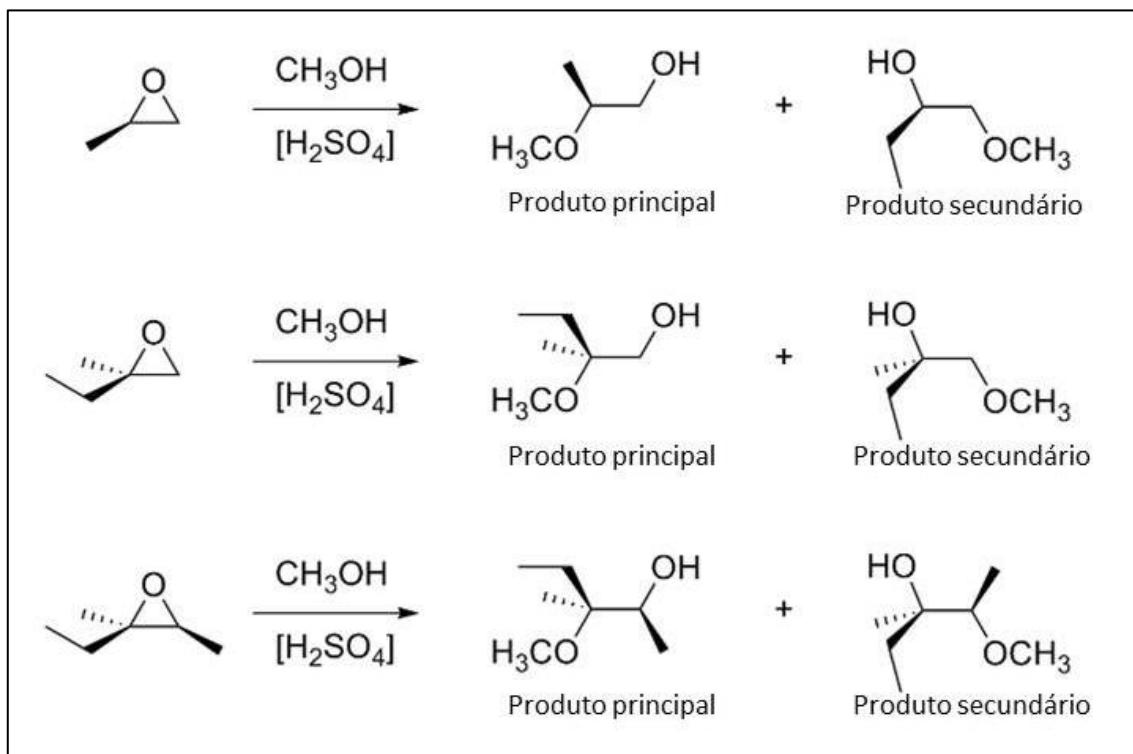


Figura 1– Exemplos de reações regioseletivas de abertura de anéis oxirano em etanol ácido. As reações originam isômeros constitucionais distintos.

Os epóxidos e os produtos formados a partir das reações de abertura dos anéis oxirano são reagentes de partida e intermediários versáteis para a síntese de moléculas com atividades biológicas interessantes, sendo vantajosa a pureza estereoquímica para a sua utilização como substratos em sínteses assimétricas (Finney, 1998). Entretanto, para os organismos, esses epóxidos reativos podem possuir diferentes efeitos, sendo nocivos ao reagirem com alvos biológicos críticos como o DNA e proteínas, gerando efeitos mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos (Decker *et al.*, 2009), sendo necessário um mecanismo natural de detoxificação. Já os epóxidos produzidos a partir de hidrocarbonetos alifáticos endógenos, presentes em microrganismos, plantas e animais, em geral, são relativamente estáveis em condições fisiológicas, não apresentam efeitos

nocivos para as células e organismos (Paillasse *et al.*, 2012), no entanto, eles devem ser controladamente transformados pela ação do metabolismo (Morisseau, 2013).

As Epóxido Hidrolases (EH) são enzimas responsáveis pela catálise da abertura dos anéis epóxido originando dióis vicinais como produtos, sendo menos reativos, menos mutagênicos, menos tóxicos e que são excretados mais rapidamente das células por apresentarem maior solubilidade quando comparados aos epóxidos. Nas reações de catálise, essas enzimas utilizam a água como único co-substrato, o que é uma característica particular dessa classe enzimática. A atividade das EHs não requer cofatores, grupos prostéticos ou íons metálicos, o que assemelha o seu mecanismo de ação às serino proteases (Rink *et al.*, 1997; Morisseau *et al.*, 2002). A Figura 2 apresenta um exemplo de reação geral de abertura dos anéis oxirano pelas EHs, em que inicialmente ocorre a abertura do epóxido e o carboxilato realiza o ataque nucleofílico.

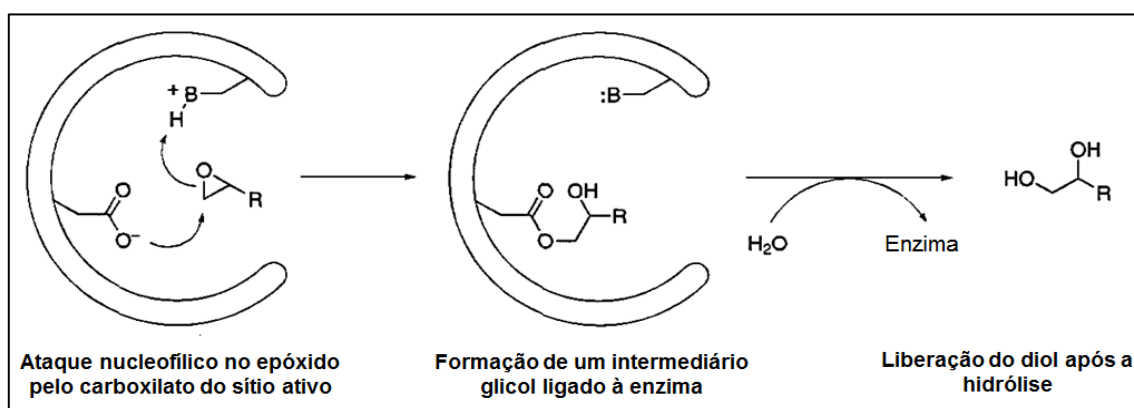


Figura 2– Mecanismo geral da hidrólise enzimática de epóxidos. “B” representa o nucleófilo aceptor de elétrons presente no sítio ativo. Fonte: adaptada a partir de Finney, 1998.

As EHs apresentam diferentes papéis biológicos de acordo com o organismo em que estão presentes. Em microrganismos elas são predominantemente intracelulares,

atuando na adaptação ao ambiente metabolizando fontes naturais de carbono (Van Der Werf *et al.*, 1999) e contaminantes ambientais (Jacobs *et al.*, 1991). Em patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*, atuam na virulência e desintoxicação (Cole *et al.*, 1998). Em plantas e animais as EHs metabolizam lipídeos (Newman *et al.*, 2005; Morisseau, 2013) e em insetos são responsáveis pelo metabolismo dos hormônios juvenis (Newman *et al.*, 2005). No fígado de mamíferos são encontrados dois tipos distintos de EHs, a microsomal (mEH) que está presente no retículo endoplasmático e a solúvel (sEH), que pode estar contida no citosol ou pode ser excretada das células (Wixtrom e Hammock, 1985; Meijer e Depierre, 1988). As enzimas microsomais hidrolisam toxinas xenobióticas, como epóxidos capazes de alquilar proteínas e ácidos nucleicos (Hammock *et al.*, 1997). As solúveis agem no fígado, desempenham papéis biológicos nos rins e tecido vascular devido à sua atividade contra epóxidos lipídicos (Fang *et al.*, 2001; Imig *et al.*, 2002), hidrolisando metabólitos provenientes da atividade do citocromo P450 e, dessa forma, auxiliam na regulação da pressão sanguínea vascular, renal e cardíaca (Fleming, 2001). Além disso, essas enzimas são responsáveis pela hidrólise da leucotoxina e isoleucotoxina, gerando dióis que implicam na cascata inflamatória (Moghaddam *et al.*, 1997). Diversos estudos estruturais dessas epóxido hidrolases com base na cristalografia e dados de difração de raios-X tiveram por objetivo identificar os sítios de ligação a diferentes inibidores e quais dessas moléculas apresentaram maior afinidade pela enzima (Tanaka *et al.*, 2011; Amano *et al.*, 2014). Desse modo constituem uma importante ferramenta no tratamento de diversos quadros clínicos que apresentam relação direta ou indireta com essa classe de enzimas.

Além das funções e aplicações citadas anteriormente, as EHs são responsáveis pela biosíntese dos antibióticos poliéteres ionóforos (Dutton *et al.*, 1995). Esses compostos pertencem à classe dos poliéteres policíclicos, um subgrupo de produtos naturais com considerável diversidade estrutural, propriedades antifúngica, anticâncer e antibiótica, cuja biossíntese é de origem policetídica ou terpênica (Vilotijevic e Jamison, 2009). Os primeiros poliéteres ionóforos foram isolados no início da década de 1950 e, desde então, centenas deles foram caracterizados (Westley *et al.*, 1981; Westley, 1986; Dutton *et al.*, 1995). Todos são produzidos por actinomicetos, derivando em sua grande maioria do gênero *Streptomyces*. Sua função biológica está diretamente relacionada com a sua capacidade de formar complexos lipossolúveis reversíveis, facilitando o transporte de íons específicos através das membranas biológicas (Pressman, 1976; Taylor *et al.*, 1982; Russell e Houlihan, 2003). Desse modo, ocorrem alterações nos gradientes de concentração normais das células, resultando em desequilíbrio iônico, mudanças de pH, sobrecarga de cálcio, peroxidação dos lipídeos e ruptura das membranas plasmáticas (Russell e Houlihan, 2003; Novilla, 2012).

Estruturalmente, os ionóforos possuem anéis éter saturados de 5 ou 6 carbonos (Figura 3) e podem apresentar outros elementos estruturais incluindo os grupos hidroxil, metoxil, halo e fenil e sistemas heterocíclicos incomuns, alguns dos quais podem ser importantes para a atividade biológica. De modo geral, exibem um grupo carboxil em uma das extremidades e um ou dois grupos hidroxil em outra (Pressman, 1976).

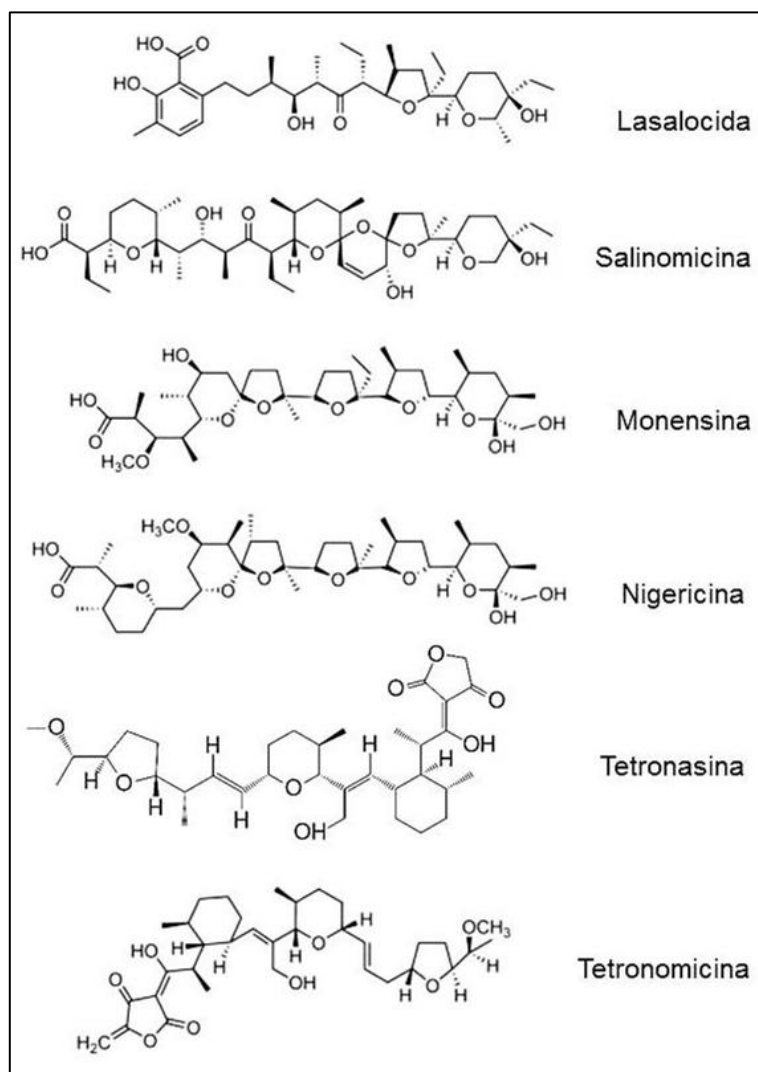


Figura 3– Exemplos de antibióticos poliéteres ionóforos.

A lasalocida (Berger *et al.*, 1951; Harned *et al.*, 1951) produzida a partir de *Streptomyces lasaliensis* (Migita *et al.*, 2009), é um dos ionóforos policíclicos mais relevantes. Juntamente com a salinomicina (produzida por *S. albus*) (Miyazaki *et al.*, 1974), ambos os compostos apresentam grande importância na criação de aves, já que ao serem inseridas junto à alimentação desses animais, atuam como coccidiostáticos auxiliando no controle e prevenção da coccidiose ocasionada por diversas linhagens de *Eimeria* spp e infecções bacterianas secundárias, diminuindo grandemente a

mortalidade das aves (Shumard e Callender, 1967; Mathis *et al.*, 2014). Algumas vacinas disponíveis contra a coccidiose são compostas por linhagens vivas de *Eimeria* sp relativamente tolerantes aos ionóforos, o que permite a combinação do efeito quimioterapêutico precoce do ionóforos com o efeito profilático tardio da vacinação (Tewari e Maharana, 2011). Essas vacinas apresentam três espécies diferentes do microrganismo (*E. acervulina*, *E. tenella* e *E. maxima*) e possuem a vantagem de permitir o uso de ionóforos durante as primeiras semanas de idade quando a imunidade não é completa e as aves permanecem susceptíveis, sendo que o antibiótico limita o aumento da infecção durante o período de desenvolvimento da imunidade (Vermeulen *et al.*, 2001). Os ionóforos carboxílicos, quando administrados na alimentação das aves, afetam diretamente os estágios assexual e sexual do desenvolvimento de *Eimeria* sp por causar falha no transporte normal dos íons Na^+ e K^+ (Smith *et al.*, 1981; Smith e Galloway, 1983). Como exemplo desse mecanismo, o antibiótico permite a entrada de cátions por meio da membrana plasmática e, como consequência, há aumento na atividade da bomba de sódio e potássio, diminuição do ATP interno e estimulação da glicólise no microrganismo. A contínua exposição a esse composto resulta em um aumento do gradiente osmótico e consequente entrada de água, com isso, o microrganismo necessita de energia para manter a homeostase e quando há esgotamento energético, ocorre a lise celular e morte do parasita (Smith *et al.*, 1981; Mehlhorn *et al.*, 1983).

Em criações de animais ruminantes, a lasalocida e a monensina (*S. cinnamomensis*) (Pressman *et al.*, 1967) são utilizadas como aditivos alimentares que atuam no metabolismo exercendo grande importância no manejo nutricional desses

animais e prevenindo desordens metabólicas (Bergen e Bates, 1984). A tetronasina (TSN) (Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010) produzida pela actinobactéria *Streptomyces longisporoflavus*, assim como a lasalocida, também tem importância no metabolismo e ganho de peso em ruminantes (Davies e Broome, 1982; Davies *et al.*, 1982). Esses ionóforos promovem a alteração da população bacteriana do rúmen diminuindo as bactérias Gram-positivas e aumentando o número das Gram-negativas (Bergen e Bates, 1984; Russell e Strobel, 1989), além de reduzirem o número de protozoários ruminais (Beauchemin *et al.*, 2008).

Durante a digestão ruminal, os microrganismos convertem os carboidratos em ácidos graxos voláteis (AGV) (Bergen e Bates, 1984; Corah, 1991) como por exemplo, os ácidos acético, propiônico e butírico, que são os AGVs mais importantes gerados nesse processo. Com as populações normais de Gram-positivas, são produzidas maiores concentrações de ácido acético e butírico e o ácido propiônico em menores quantidades, sendo este último o principal precursor de glicose no metabolismo dos ruminantes. Com a adição dos ionóforos na alimentação e, a consequente mudança na microbiota ruminal, as bactérias Gram-negativas produzem concentrações maiores de ácido propiônico e menores dos ácidos acético e butírico, melhorando a eficiência da fermentação do rúmen o que resulta na economia de quantidades substanciais de energia (Bergen e Bates, 1984; Russell e Strobel, 1989; Callaway *et al.*, 2003; Novilla, 2012) e o aumento de peso dos animais. Como a fermentação gera a produção de gases metano e amônia, os ionóforos também contribuem para a redução desses gases por diminuir a disponibilidade de H_2 para a produção de CH_4 (Tedeschi *et al.*, 2003; Patra, 2012). No gado leiteiro, os ionóforos são responsáveis pelo aumento da produção do leite com

níveis reduzidos de gordura (Hayes *et al.*, 1996; Duffield *et al.*, 2003). Os ionóforos são considerados seguros quando usados nas espécies-alvo dentro das dosagens recomendadas pelo fabricante. A intoxicação pode ocorrer quando dosagens elevadas desses antibióticos são adicionadas aos alimentos ou quando estes são incluídos inadvertidamente ou acidentalmente em dosagens não corretas para determinada espécie animal (Nogueira *et al.*, 2009).

As fontes de novas EHs não estão limitadas aos (micro)organismos conhecidos. O isolamento de novos microrganismos a partir de amostras de água e solo e a posterior realização de ensaios enzimáticos com diferentes concentrações de epóxidos, principalmente o óxido de estireno, no qual é medida a quantidade dos epóxidos que não foram hidrolisados, constitui um método prático para averiguar se determinada linhagem apresenta atividade para epóxido hidrolases. Como exemplos de microrganismos do solo, estão os gêneros *Streptomyces* sp e *Trichoderma* sp. O gênero *Streptomyces* sp, que possui mais de 500 espécies descritas, é constituído por actinomicetos que correspondem à 40% do total de bactérias presentes no solo. Esses microrganismos são responsáveis pela síntese de uma ampla variedade de produtos naturais de interesse biotecnológico, produzindo aproximadamente dois terços dos antibióticos que ocorrem naturalmente (Mohanraj e Sekar, 2013). Os estreptomicetos sintetizam uma série de enzimas de importância ecológica como as quitinases, proteases e celulasas que possuem atividade fungicida para algumas linhagens de fungos patogênicos e também participam da decomposição de matéria vegetal presente no solo (Golinska e Dahm, 2011). Além disso, produzem as epóxido hidrolases, porém o papel

fisiológico que elas apresentam nesses estreptomicetos ainda não está claramente elucidado (Zocher *et al.*, 2000).

Outra classe de microrganismos que se destaca pela produção de epóxido hidrolases é o gênero de fungos não-lignolíticos *Trichoderma* sp que caracterizam-se pela alta tolerância a compostos poluentes. Existem diversos estudos que avaliam a capacidade que esses organismos apresentam de realizar a biorremediação do solo contaminado por organoclorados provenientes de agrotóxicos (Matsumura e Boush, 1968; Smith, 1995; Kataoka *et al.*, 2010; Senthilkumar *et al.*, 2011; Argumedo-Delira *et al.*, 2012). Nesses microrganismos as monooxigenases do citocromo P450 e as epóxido hidrolases são responsáveis por realizar as reações de detoxificação e a catálise da biotransformação xenobiótica (Marco-Urrea *et al.*, 2015) a partir da degradação da dieldrina, gerando aldrina *trans*-diol (Kataoka *et al.*, 2010). Além disso, estudos recentes com as EHs de *Trichoderma reesei* (De Oliveira *et al.*, 2016a; b) demonstraram por meio de testes enzimáticos com óxido de estireno que essas enzimas apresentam a propriedade de enantiopreferência em uma mistura racêmica do substrato testado.

A propriedade de enantiopreferência ou enantiosseletividade das epóxido hidrolases permite com que essas enzimas atuem preferencialmente em um dos enantiômeros de uma mistura racêmica, o qual será convertido no diol correspondente. Nessas reações, os produtos estereoisoméricos são formados em quantidades desiguais o que é conhecido como excesso enantiomérico (ee). A partir do ponto de vista da química sintética, as EHs consideradas ideais apresentam alta enantiosseletividade, cuja reação possui rendimento teórico máximo de 50%. Nesse caso, apenas um dos epóxidos da mistura racêmica é convertido em um produto diol e o epóxido que não sofre a

reação apresenta-se enantiopuro ao final desse processo (Figura 4A). Além disso, também apresentam grande interesse as enzimas com baixa enantiosseletividade e elevado grau de enantioconvergência, pois apresentam um rendimento teórico de 100%, em que todos os epóxidos da mistura racêmica são convertidos em um único diol enantiopuro (Archelas *et al.*, 2016). Estas propriedades de enantiosseletividade e enantioconvergência dependem, em grande parte, da procedência da enzima, ou seja, do microrganismo de origem, e está essencialmente relacionado ao arranjo estrutural do sítio ativo que influencia no reconhecimento de um enantiômero específico (Costa e Amorim, 1999; Archelas *et al.*, 2016).

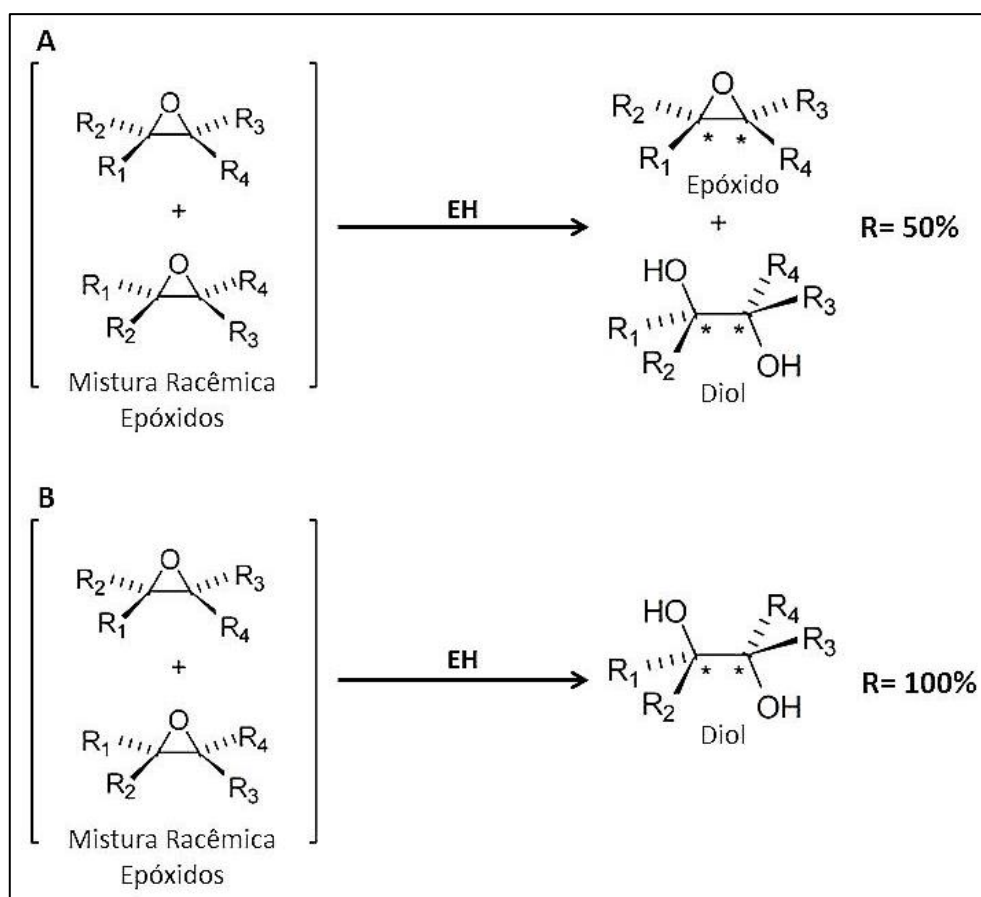


Figura 4– Exemplos de reações enantiosseletivas realizadas por epóxido hidrolases. **A)** Reação de alta enantiosseletividade e rendimento teórico de 50%. **B)** Reação de baixa enantiosseletividade e elevada enantioconvergência com rendimento teórico de 100%. As estrelas representam os centros quirais. Fonte: adaptada a partir de (Archelas e Furstoss, 2001).

Epóxidos e dióis enantiopuros são intermediários quirais ou blocos de construção que podem ser utilizados na síntese de compostos biologicamente ativos como antibióticos (Ueberbacher *et al.*, 2005), drogas antifúngicas (Monfort *et al.*, 2004), antiandrogênicos (Fujino *et al.*, 2006), receptores agonistas e antagonistas (Monterde *et al.*, 2004), heteroesteróides (Bottalla *et al.*, 2007), inibidores de protease do HIV (Pedragosa-Moreau *et al.*, 1996; Benedetti *et al.*, 2014), drogas antiinflamatórias não esteroidais (Cleij *et al.*, 1999) e outros produtos naturais. Devido à amplitude de funções biológicas, implicações em diversas moléstias e propriedades enantioseletivas, além de serem encontradas em diversos organismos, desde os procariotos até mamíferos, o estudo funcional, bem como estrutural das EHs apresenta grande importância não apenas na área médica e farmacêutica, como também na indústria química na seleção de compostos enantioméricos com grau de pureza superior (Archelas e Furstoss, 2001). Essa é uma importante justificativa para se investir no estudo dessas enzimas, em que a mutagênese sítio-dirigida, seguida pela cristalização e resolução das estruturas cristalográficas oferecem as bases necessárias para se conhecer seu mecanismo, modos de ação e inibidores de substrato. A grande maioria das EHs descritas na literatura até o presente momento pertencem à família de hidrolases clássicas com conformação estrutural α/β , o que inclui as esterases e demais enzimas com mecanismos semelhantes de ação. As demais EHs são enzimas conhecidas como Epóxido Hidrolases não-clássicas ou Limoneno Epóxido Hidrolases (LEH) que possuem uma série de particularidades no seu modo de ação e estão envolvidas na síntese dos poliéteres policíclicos. Abaixo estão descritas as principais características estruturais e funcionais de cada um dos tipos de EHs.

a) α/β -Hidrolases

As Epóxido Hidrolases clássicas ou α/β -hidrolases recebem essa denominação devido à sua conformação estrutural. Essas enzimas apresentam dois domínios distintos: 1) um domínio conservado, também denominado de domínio catalítico, hidrolase ou C-terminal, que é constituído por uma β -folha central cercada por α -hélices e 2) um domínio variável, também conhecido como domínio cap ou N-terminal, que localiza-se acima do sítio ativo e é formado geralmente por um número variável de α -hélices. Outras enzimas estruturalmente semelhantes às EHs com arranjo de α -hélices e β -folhas são as esterases, haloalcano dehalogenases, lipases e amidases (Heikinheimo *et al.*, 1999; Lenfant *et al.*, 2013). Elas utilizam um mecanismo catalítico que envolve a tríade catalítica conservada Asp/Ser/Cys-His-Asp/Glu (nucleófilo-histidina-ácido), dois resíduos de Tirosina e uma molécula de água localizados na parte superior dos loops do domínio catalítico (Archelas *et al.*, 2016). Como exemplo, a α/β -hidrolase de *M. tuberculosis* (Mtb EH) possui uma cadeia polipeptídica com 356 aminoácidos (Argiriadi *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2004), o domínio hidrolase (resíduos 1-129 e 276-356) é composto por uma β -folha formada por oito fitas paralelas e curvadas cercadas por cinco α -hélices e o domínio cap (resíduos 130-275) apresenta sete α -hélices sucedidas por loops flexíveis (Biswal *et al.*, 2008). A Figura 5 apresenta a conformação estrutural geral da Mtb EH.

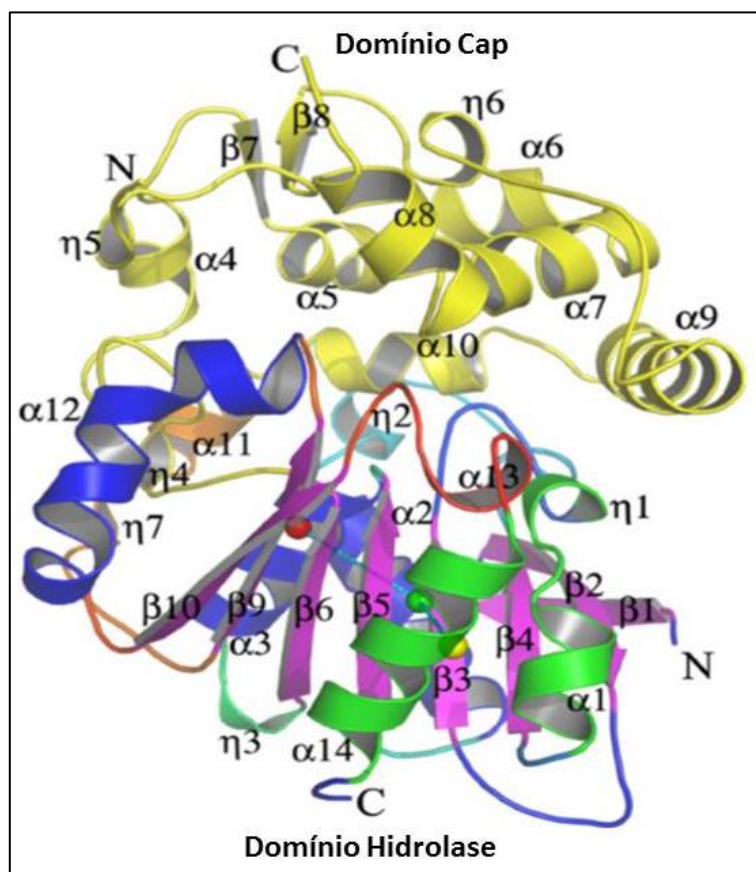


Figura 5—Visão geral da estrutura secundária da Mtb EH. O domínio hidrolase apresenta as fitas β em magenta e as α -hélices em azul e verde. O domínio cap está representado em amarelo. Fonte: adaptado de Biswal *et al.*, 2008.

Quanto ao arranjo do sítio ativo, a Mtb EH possui a tríade catalítica que compreende os resíduos Asp104-His333-Asp302. O Asp104 é o nucleófilo e localiza-se em um pequeno loop que conecta a fita $\beta 5$ à hélice $\alpha 3$, o que é conhecido como “cotovelo nucleofílico”. O resíduo His333 é um resíduo básico que atua ativando uma molécula de água, e está situado em um longo loop que conecta a fita $\beta 10$ e hélice $\alpha 13$ C-terminal ao domínio hidrolase. O Asp 302 orienta o grupo imidazol da His333 e está localizado no loop que conecta a fita $\beta 9$ e a hélice $\alpha 12$ ao domínio hidrolase. Diversos outros resíduos desempenham um papel importante no mecanismo de catálise dessa

enzima como as tirosinas Tyr164, Tyr272 e Tyr105 e a fenilalanina Phe36 (Figura 6) (Biswal *et al.*, 2008).

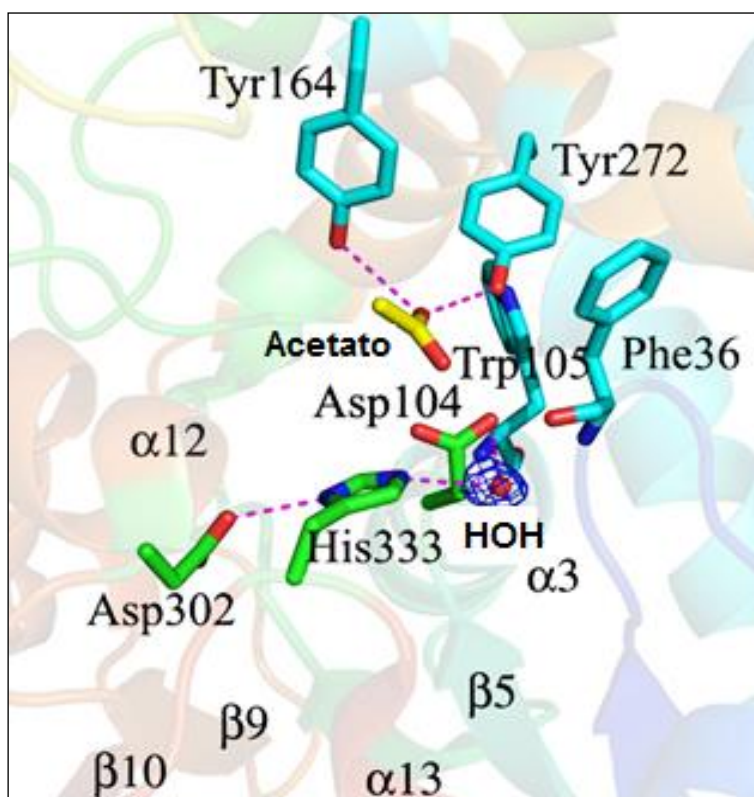


Figura 6– Resíduos do sítio ativo da Mtb EH. Os resíduos Asp104, His333 e Asp302 formam a tríade catalítica e estão representados em verde. Os demais resíduos que auxiliam na catálise estão representados em ciano – Tyr164, Tyr272, Phe36 e Trp105. A água é representada por uma esfera vermelha e as ligações de hidrogênio são representadas por linhas pontilhadas em magenta. Nessa estrutura houve a incorporação do íon acetato (em amarelo) que forma interações de hidrogênio com grupos fenólicos OH dos resíduos Tyr164 e Tyr272. Fonte: adaptada de Biswal *et al.*, 2008.

A atividade das enzimas com configuração α/β -hidrolase é realizada em três diferentes etapas, aqui representadas na Figura 7 a partir da epóxido hidrolase de *M. tuberculosis*: 1) O aspartato Asp104, nucleófilo da tríade catalítica, abre o anel epóxido através do ataque nucleofílico (Arand *et al.*, 1996; Rink *et al.*, 1997), sendo esta reação auxiliada pelas tirosinas conservadas Tyr164 e Tyr272 que estão localizadas no domínio cap (Argiriadi *et al.*, 2000). Nessa etapa, o ácido carboxílico do aspartato ataca um

carbono do anel oxirano do substrato epóxido ligado, resultando em um éster intermediário formado transitoriamente e as tirosinas polarizam o anel epóxido ao formar ligações de hidrogênio com o oxigênio oxirano; 2) O intermediário resultante, uma alquil-enzima (éster intermediário), é subsequentemente hidrolisada por uma molécula de água ativada pela histidina His333 que atua como aceptor de prótons que, por sua vez é auxiliado pelo resíduo ácido, Asp302. A reação é estabilizada por duas amidas suporte que contribuem na manutenção do nucleófilo catalítico dos demais resíduos (Nardini *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2000); 3) Na última etapa, o produto diol formado é liberado, deixando a tríade catalítica da enzima que é restaurada (Biswal *et al.*, 2008; Archelas *et al.*, 2016).

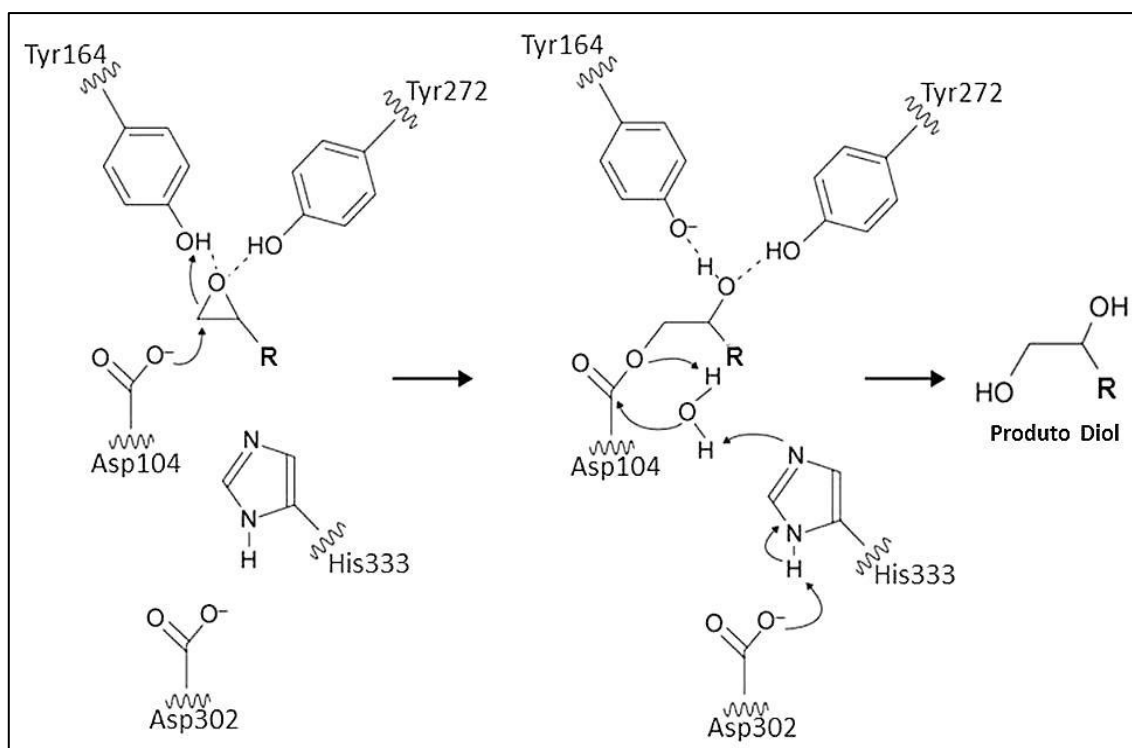


Figura 7– Mecanismo catalítico das α/β -hidrolases representado a partir da EH de *M. Tuberculosis*. Fonte: adaptada a partir de Biswal *et al.*, 2008.

Dentre as epóxido hidrolases clássicas, estão as enzimas B1EPH2, identificada no genoma de *Streptomyces wadayamensis* e a TrEH, uma EH putativa presente no genoma do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. Essas enzimas são recentes objetos de estudos do nosso grupo de pesquisas em conjunto com colaboradores. Como essas EHs ainda não apresentam estruturas cristalográficas conhecidas ou publicadas na literatura, faz-se de grande interesse o seu estudo para averiguar suas propriedades catalíticas e enantioseletivas, além de investigar seus pormenores estruturais para comparação com outras epóxido hidrolases clássicas conhecidas de microrganismos.

Quanto à enzima de *T. Reesei*, TrEH, De Oliveira e colaboradores (2016) realizaram os primeiros experimentos de caracterização e atividade enzimática. De acordo com testes enzimáticos de enantioseletividade, utilizando o óxido de estireno como substrato, foi demonstrado que essa enzima hidrolisa o (S)-óxido de estireno de modo mais eficiente que o enantiômero (R), indicando que essa enzima apresenta elevado grau de enantioseletividade (De Oliveira *et al.*, 2016b). Com isso, é de grande valia a resolução estrutural dessas enzimas para verificar o mecanismo de funcionamento do sítio catalítico que comprove o processo de enantioseletividade dessas enzimas.

b) Limoneno Epóxido Hidrolases

As Limoneno Epóxido Hidrolases (LEH), ou Epóxido Hidrolases não-clássicas possuem essa nomenclatura devido à semelhança estrutural que apresentam com a limoneno-1,2-epóxido hidrolase de *Rhodococcus erythropolis* DCL14 (Figura 8A) (Van Der Werf *et al.*, 1998) que foi a primeira enzima dessa classe a ser identificada. As LEH são uma parte da via de degradação do limoneno em *R. erythropolis* DCL14 que permite que a bactéria utilize o composto terpênico como única fonte de carbono e energia, catalizando a hidrólise do limoneno-1,2-epóxido gerando o diol vicinal limoneno-1,2-diol (Figura 8B) (Van Der Werf *et al.*, 1999). As LEH são diferentes das α/β hidrolases tanto no aspecto funcional como estrutural. Por exemplo, as LEH são muito menores, não apresentam os resíduos catalíticos altamente conservados com as α/β -hidrolases (Barbirato *et al.*, 1998) e, além disso, apresentam um enovelamento totalmente diferente com uma estrutura nova de sítio ativo (Arand *et al.*, 2003). Por fim, diversos experimentos demonstraram que o mecanismo de catálise entre ambas as classes de EHs é substancialmente distinto (Van Der Werf *et al.*, 1998; Van Der Werf *et al.*, 1999; Arand *et al.*, 2003), principalmente pela hidrólise dos epóxidos ocorrer sem a formação de um intermediário covalente enzima-substrato nas LEH (Van Der Werf *et al.*, 1999; Arand *et al.*, 2003).

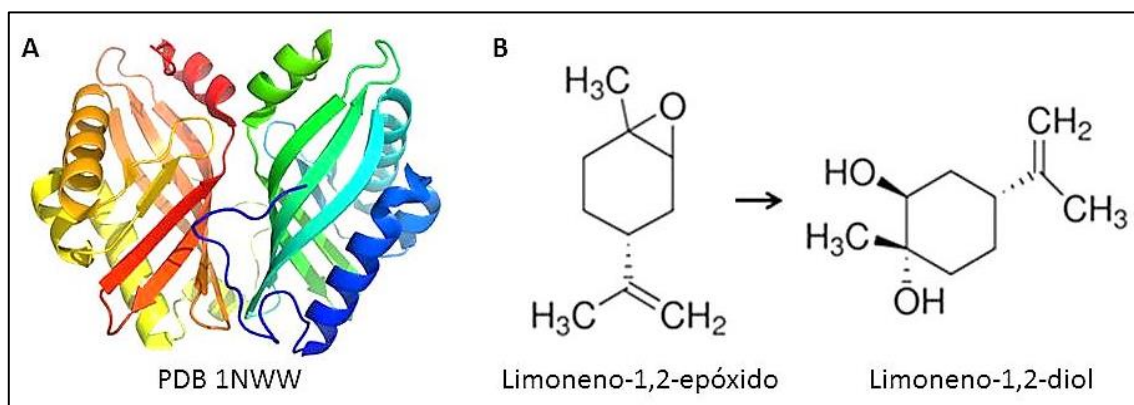


Figura 8– Limoneno Epóxido Hidrolase de *Rhodococcus erythropolis* DCL14. **A)** Estrutura geral identificada no Protein Data Bank como 1NWW. **B)** Exemplo da reação do Limoneno realizada pela LEH de *R. erythropolis*.

Tanto a estrutura quanto o modo de ação das LEH podem ser exemplificadas com base na síntese do poliéter ionóforo lasalocida. A síntese desse antibiótico é realizada a partir da Lsd19, enzima encontrada no genoma de *Streptomyces lasaliensis*. Hotta e colaboradores (Hotta *et al.*, 2012) obtiveram a primeira estrutura cristalográfica da Lsd19 na forma de holoenzima e em complexo com análogos de substrato e, posteriormente, Wong e colaboradores (Wong *et al.*, 2015) resolveram a mesma estrutura em complexo com o substrato nativo lasalocida. A Lsd19 consiste em dois domínios altamente homólogos compostos por três α -hélices e uma β -folha com seis fitas arranjadas de forma semelhante a um cone, cuja cavidade forma um profundo sítio de ligação ao substrato. Os domínios N-terminal ou Lsd19A e C-terminal ou Lsd19B são ligados por um pequeno loop e conformações estruturais semelhantes, porém o domínio Lsd19B apresenta um loop adicional com 18 resíduos de comprimento próximo à entrada do sítio ativo (Figura 9) (Hotta *et al.*, 2012).

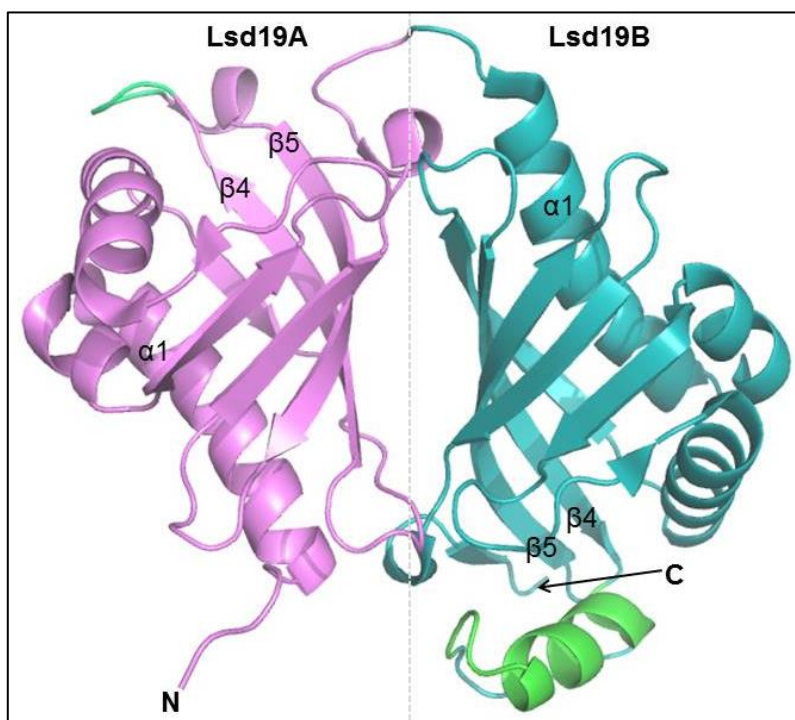


Figura 9– Visão geral do fold da estrutura da Lsd19. O domínio N-terminal ou Lsd19A está representado em rosa; o domínio C-terminal ou Lsd19B está representado em ciano. O extra loop-hélice-loop estão representados em verde. Fonte: elaborada pelo autor a partir de Hotta *et al.*, 2012.

De acordo com os estudos realizados por Hotta *et al.*, 2012 e Wong *et al.*, 2015, o sítio ativo do domínio Lsd19A é formado pelos resíduos Tyr14, Asp38, Asp65, Thr100, Val102, Met117, Trp121 e Trp128 (Hotta *et al.*, 2012) que estão representados na Figura 10A onde também podem ser observadas três moléculas de formato provenientes do tampão de cristalização. Quanto ao domínio Lsd19B, os aminoácidos que compõem o sítio ativo são His146, Asp170, Arg177, His186, Glu197, His231, Tyr251, Met253, Met266 e Trp270, sendo que dentre eles, os resíduos putativos responsáveis pela catálise do processo de formação dos anéis éter do antibiótico são His146, Asp170, Glu197 e Tyr251. Nesse domínio a metionina 253 promove uma diminuição na profundidade da cavidade catalítica em comparação à cavidade do domínio Lsd19A, o que permite que apenas um epóxido ciclizado se ligue ao sítio ativo

em uma única orientação, sendo determinante para a seletividade do substrato. A Figura 10B apresenta o sítio ativo do domínio C-terminal em complexo com o substrato lasalocida, a disposição dos resíduos de aminoácidos e as interações de hidrogênio existentes entre os resíduos e o substrato; a molécula de glicerol é proveniente do tampão de cristalização (Wong *et al.*, 2015).

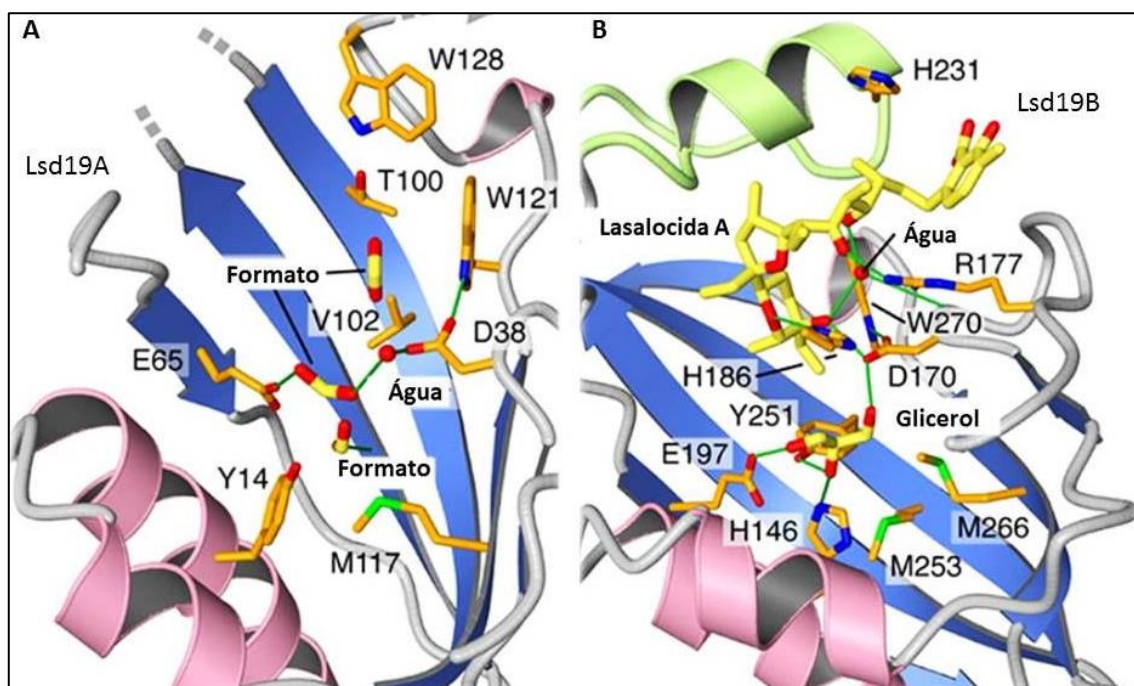


Figura 10– Sítio ativo da Lsd19. **A)** Detalhe dos resíduos catalíticos do domínio Lsd19A. Em amarelo está o formato. **B)** Detalhe dos resíduos catalíticos do domínio Lsd19B. Em amarelo está representado o substrato lasalocida A. Os aminoácidos estão representados em laranja. Fonte: adaptada a partir de Wong *et al.*, 2015.

Os antibióticos e outros produtos naturais com diversas atividades biológicas e propriedades farmacológicas geralmente são classificados como policetídeos, metabólitos secundários relacionados à sobrevivência e defesa do organismo produtor. A Lsd19, assim como outras enzimas relacionadas à biossíntese de policetídeos, apresenta o cluster gênico policetídeo-sintase (PKS) tipo I. Esse sistema gênico foi descoberto inicialmente na via biossintética da eritromicina (Cortes *et al.*, 1990) e

caracteriza-se por apresentar uma série de enzimas multifuncionais organizadas em módulos, em que cada um deles é responsável pela catálise de uma etapa de alongamento da cadeia policetílica (Shen, 2003; Chan *et al.*, 2009). Na síntese da lasalocida, estão envolvidos sete genes policetídeo-sintase, genes epoxidase e epóxido hidrolase para a formação sequencial de éteres cíclicos e diversos genes putativos responsáveis pelo fornecimento de etilmalonil-CoA (Migita *et al.*, 2009). A Lsd18 ou LasC, é uma epoxidase putativa presente no cluster gênico PKS da Lsd19, que possivelmente está envolvida na formação do precursor da lasalocida, a bisepoxiprelalasalocida, composta de dois anéis epóxido (bisepóxido) (Smith *et al.*, 2008) o que pode ser comprovado por Migita e colaboradores (2009) que realizaram a deleção da região gênica correspondente à Lsd18 e verificaram que na ausência dessa enzima a lasalocida não foi produzida (Migita *et al.*, 2009).

A partir da síntese da bisepoxiprelalasalocida A, ocorrem reações de abertura ou quebra dos anéis epóxido e sucessivas ciclizações que permitem a formação do antibiótico como produto final (Cane *et al.*, 1983; Minami *et al.*, 2011; Hotta *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2015). Baldwin propôs algumas regras no que se refere à facilidade do processo de fechamento de anéis ou ciclizações na química orgânica. Essas regras são de natureza empírica e foram elaboradas para aplicação em sistemas onde o átomo de carbono que sofre o ataque nucleofílico apresenta geometria bem definida. Um prefixo numérico é utilizado para indicar o número de átomos do anel a ser formado, seguido pelos termos Exo – quando a ligação que se quebra é exocíclica ao anel que se forma – ou Endo – indicando a quebra de uma ligação endocíclica ao anel que está se formando (Baldwin, 1976). Uma reação pode ser favorável ou desfavorável com base

no alinhamento adequado dos orbitais moleculares; as reações favoráveis são aquelas em que o comprimento e a natureza da cadeia que realizará a ligação permitem com que os átomos formem facilmente a junção final do anel e, conseqüentemente são energeticamente favoráveis; já as reações desfavoráveis, exigem severas distorções nas distâncias e ângulos de ligação, dificultando o fechamento do anel. As reações desfavoráveis são conhecidas como Anti-Baldwin, já que contrariam as regras gerais de ciclização (Vilotijevic e Jamison, 2009; Gilmore e Alabugin, 2011).

A LEH de *Streptomyces lasaliensis*, durante a síntese da lasalocida, apresenta dois mecanismos distintos de acordo com as regras de Baldwin. Primeiramente, o domínio Lsd19A cataliza a abertura dos epóxidos da bisepoxiprelasalocida A e, posteriormente, realiza uma reação exocíclica de fechamento de anel, levando à formação de um anel com cinco átomos; essa primeira reação é favorável. Em seguida, o domínio Lsd19B realiza uma segunda etapa de fechamento de anéis, uma reação endocíclica que resulta em um anel de seis átomos. Essa segunda reação desfavorável, ou Anti-Baldwin, é determinante no processo de regiosseletividade da enzima e está presente na biossíntese de outros antibióticos como a narasina e salinomycin (Baldwin, 1976; Shichijo *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008; Migita *et al.*, 2009; Gilmore e Alabugin, 2011; Hotta *et al.*, 2012). A Figura 11 apresenta o mecanismo de ciclização da lasalocida a partir do substrato bisepoxiprelasalocida A.

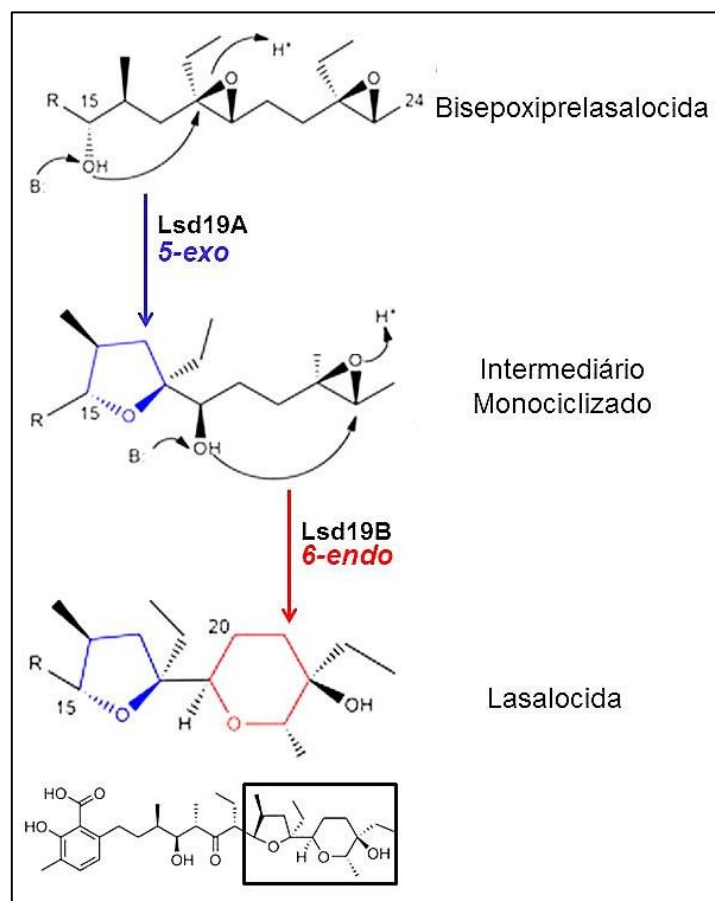


Figura 11– Representação do mecanismo de formação de éteres cíclicos no processo de síntese da lasalocida A. No esquema, os anéis com cinco átomos são representados em azul e indicam as reações favoráveis do tipo “5-exo” e os anéis com seis átomos são representados em vermelho e indicam as reações desfavoráveis do tipo “6-endo” (ou anti-Baldwin). Fonte: Adaptado a partir de Hotta *et al.*, 2012 e Wong *et al.*, 2015.

Outros exemplos de antibióticos poliéteres sintetizados a partir das limoneno epóxido hidrolases, são a tetronasina (TSN) e a tetronomicina (TMN), poliéteres tetronatos cuja biosíntese apresenta uma série de reações estereoespecíficas complexas e são estruturalmente diferentes dos outros ionóforos (Grandjean e Laszlo, 1983). Durante a biosíntese da TSN e da TMN, ocorre a formação de um grupo epóxido que é aberto para formar um éter furano, sendo que duas classe de enzimas estão diretamente envolvidas nesse processo: as epoxidases TmnC e TsnC que controlam a

regioespecificidade e a estereoespecificidade da etapa de ciclização oxidativa; e as LEH TmnB e TsnB responsáveis pela abertura dos epóxidos (Demydchuk *et al.*, 2008).

Assim como as demais LEH, a TsnB e TmnB apresentam um sítio ativo formado por diversos resíduos hidrofóbicos e uma tríade catalítica na região mais profunda do sítio ativo: Asp38, His54 e Glu65, resíduos estes essenciais na catálise de outras LEHs, incluindo a Lsd19 relacionada à síntese da lasalocida. Por um lado do sítio ativo os resíduos Asp38 e His54 são responsáveis pelo ataque nucleofílico do grupo epóxido; pelo outro lado, o resíduo Glu65 é responsável pela ativação do grupo epóxido. Na estrutura da TsnB, o resíduo Trp121 é conservado, indicando sua possível relação no reconhecimento e estereoseletividade do substrato (Hotta *et al.*, 2012).

Nosso grupo de pesquisa obteve as estruturas tridimensionais da TsnB e da TmnB e, por isso, podemos levantar hipóteses sobre os mecanismos de reconhecimento por substratos para essas enzimas. Pela análise do sítio ativo dessas enzimas é possível observar que a presença de resíduos hidrofóbicos com cadeias laterais longas parece exercer influência no posicionamento de substratos no sítio ativo (manuscrito em preparação). Entretanto, para o completo entendimento desses mecanismos de estereo e regioesletividade, análises funcionais mais aprofundadas são necessárias.

Apesar das epoxidases relacionadas com a formação de grupos epóxidos nas cadeias policetídicas dos poliéteres não terem sido estudadas e nenhum estudo bioquímico e estrutural ter sido feito, acredita-se que elas também coordenam a regio e a estereoseletividade da formação dos éteres cíclicos desses compostos. Devido a algumas semelhanças com as escaleno epoxidases sabe-se que elas são enzimas dependentes de FAD, porém o mecanismo de catálise e a estrutura dessas enzimas são completamente

desconhecidos. Portanto, dois pontos intrigantes e extremamente interessantes do ponto de vista da biologia estrutural que ainda permanecem desconhecidos sobre a biossíntese de poliéteres ionóforos são: a própria estrutura das epoxidases e como a natureza evolui e lança de mecanismos para realizar o reconhecimento e catálise de substratos em produtos com estereoquímica tão diversa. Não se sabe como ocorre a formação desses grupos nas cadeias de policetídeos lineares, uma vez que não há qualquer estrutura para essa classe de enzima e uma análise de pesquisa utilizando o BLAST não mostra qualquer estrutura com identidade considerável com suas sequências, sendo interessante a realização de estudos enzimáticos e estruturais dessas enzimas para se tentar conhecer um pouco mais a respeito do funcionamento e mecanismo catalítico.

II – OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Compreender os mecanismos moleculares e estruturais de diferentes Epóxido Hidrolases solúveis de interesse biotecnológico e Epóxido Hidrolases envolvidas na biossíntese de antibióticos poliéteres ionóforos.

Objetivos específicos:

- Determinar as estruturas das Epóxido Hidrolases B1EPH2 e TrEH, que apresentam interesse biotecnológico e do mutante Lsd19 E197D e TsnB, envolvidas na biossíntese de antibióticos poliéteres ionóforos;
- Averiguar as propriedades enantiosseletivas dessas enzimas;
- Comparar seus sítios ativos em relação aos resíduos catalíticos e sua interação com o substrato/ligante e comparar conformação estrutural geral da enzima e do sítio ativo com outras epóxido hidrolases anteriormente estudadas.

III – MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com base nos seguintes métodos: expressão de proteínas, purificação, ensaios de cristalização, difração de raios-X e determinação estrutural. As etapas de clonagem, que antecedem a expressão das proteínas, foram realizadas pelos grupos de pesquisa de nossos colaboradores.

1) Clonagem e Expressão

a) Epóxido Hidrolase de *Streptomyces wadayamensis* – B1EPH2

A etapa de clonagem foi realizada pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira, IQ – UNICAMP. O gene B1EPH2 presente no genoma de *Streptomyces wadayamensis* A23 foi amplificado por PCR, inserido em vetor de clonagem e, em seguida, inserido no vetor de expressão pET-28b(+) (os detalhes referentes à clonagem não foram concedidos pois estão sob análise para depósito de patente). Os plasmídeos contendo o gene clonado foram fornecidos ao nosso grupo de pesquisa para a realização dos experimentos subsequentes.

Para a expressão da proteína, o vetor pET-28b(+) contendo o gene específico B1EPH2 foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) pelo método do choque térmico. As células transformadas foram distribuídas sobre placa de Petri contendo 25 mL de meio LB-Ágar (Bertani, 1951) solidificado e suplementado com Canamicina na concentração de 30 mg/mL. As placas semeadas com as células transformadas foram levadas à estufa sob temperatura de 37°C por aproximadamente 20 h para o crescimento das colônias.

Em seguida, procedeu-se com o preparo do pré-inóculo, em que uma das colônias de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformada foi transferida para 400 mL de meio LB esterilizado e suplementado com Canamicina na concentração de 30 mg/mL. O pré-inóculo foi levado ao shaker à 37°C e 200 rpm por um período de 16 h. Posteriormente, foi preparado o inóculo a partir de 6 L de meio 2x YT com Canamicina (30 mg/mL). O meio 2x YT foi feito pesando-se 5g de NaCl, 10g de extrato de levedura e 16g de triptona para cada 1 L de água destilada.

O inóculo foi levado ao shaker à temperatura de 37°C e 200 rpm até atingir a densidade ótica (OD) de 0,6, sendo a leitura realizada em comprimento de onda de 600nm. Em seguida, a expressão foi induzida com 0,4 mM de IPTG e a temperatura foi ajustada para 18°C. A cultura foi mantida sob agitação e temperatura constantes por um período de 18 h.

A cultura foi centrifugada à 6.000 rpm por 25 minutos para a formação de precipitados, sendo que os mesmos foram armazenados à -20°C e o sobrenadante foi descartado.

b) Epóxido Hidrolase de *Trichoderma reesei* – TrEH

As etapas de clonagem, expressão e purificação da TrEH foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcade do Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de proteínas, EACH – USP. A linhagem de *Trichoderma reesei* utilizada (QM 9414) foi obtida na American Type Culture Collection (ATCC 26921). A ORF TrEH foi amplificada a partir do DNA genômico de *T. reesei* por PCR com oligonucleotídeos específicos (TrEH-F: 5'-

CCGGAATTCATGGACACCAGCAAG CTCAAG-3' e TrEH-R: 5'-ACGCGTCGACCTA CAACGCAGCCTTGGT CGCACC-3'). O produto do PCR foi inserido no vetor pPROEX-HTa (Invitrogen) e a proteína recombinante foi expressada em *E. coli* BL21(DE3).

c) Mutante E197D de *Streptomyces lasaliensis* – Lsd19 (Lsd19 E197D)

Os experimentos de clonagem e avaliação da atividade do mutante *in vivo* foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Professor Peter Leadlay (Department of Biochemistry – University of Cambridge). A mutação consistiu na troca do aminoácido Ácido Glutâmico pelo Ácido Aspártico na posição 197 para avaliar qual o efeito exercido pela mudança de resíduo na estrutura e na atividade da enzima. Inicialmente o gene foi amplificado por PCR a partir do cosmídeo M7G utilizando-se a enzima Phusion® High-fidelity PCR Master Mix com tampão GC (Finnzymes) de acordo com o protocolo oferecido pelo fabricante. Os primers utilizados nas reações de PCR foram o LasB_NdeI: 5'GGG CGG GCA TAT GCC TGC GGA GAC GGT GC-3' e o LasB_HindIII: 5'-CCG GGG ACG AAT TCG TGT CGC-3'. O produto de PCR contendo o gene *lasB* foi ligado em um plasmídeo pUC18 digerido resultando no plasmídeo pUC18/*lasB*. O gene *lasB* foi excisado do plasmídeo pUC18/*lasB* por meio de digestões subsequentes com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* e posteriormente inserido no vetor digerido pET28a(+) (Novagen).

Para a expressão da proteína, o plasmídeo resultante, pET28/*lasB* foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) co-transformada com o plasmídeo contendo o sistema de chaperonas GroEL/GroES (pGro7) (Takara).

As células transformadas foram inoculadas em 200 mL de meio LB esterilizado e suplementado com os antibióticos Canamicina e Cloranfenicol na concentração de 30 mg/mL. O pré-inóculo foi levado ao shaker à 37°C e 200 rpm por um período de 16h. Em seguida, foi preparado o inóculo a partir de 4 L de meio 2x YT com Canamicina e Cloranfenicol (30 mg/mL), sendo levado ao shaker à 37°C e 200 rpm. Quando a OD atingiu o valor de aproximadamente 0,5 foi adicionado a cada litro de inóculo 1 mL de L-arabinose na concentração de 50 mg/mL para a indução da expressão das chaperonas. Na OD de 0,6 foram adicionados 400 µL de IPTG à 1M, sendo a temperatura ajustada para 18°C. Os frascos permaneceram no shaker por um período de 18 a 20 horas sob agitação de 200 rpm. O inóculo foi centrifugado à 6.000 rpm por 25 minutos e, então, os precipitados foram armazenados à -20°C.

d) Epóxido Hidrolase de *Streptomyces longisporoflavus* – TsnB

O gene codificante da enzima foi clonado pelo grupo de pesquisa do Professor Peter Leadlay (Department of Biochemistry – University of Cambridge). Os plasmídeos pET28b/TsnB contendo o gene de interesse foram fornecidos ao nosso grupo de pesquisa, onde foram realizados os experimentos subsequentes. O plasmídeo foi inicialmente transformado em *E. coli* BL21(DE3) e, as etapas seguintes que compõem a expressão da proteína foram realizadas de modo semelhante à Lsd19 E197D.

2) Purificação

No presente trabalho, foram realizados dois métodos distintos de purificação de proteínas, a cromatografia de afinidade (Porath *et al.*, 1975; Hemdan *et al.*, 1989) e cromatografia de gel filtração ou exclusão molecular (Lathe e Ruthven, 1955; Porath e Flodin, 1959; Hagel, 2001). Na cromatografia de afinidade foi utilizada a coluna NiSO₄-loaded HiTrap™ 5 mL column High Performance, GE Healthcare. Na gel filtração foram utilizadas as colunas Superdex 200 16/60 e 75 16/60, ambas da GE Healthcare. As colunas foram conectadas sistema FPLC ÄKTA Purifier e ÄKTA Start (GE Healthcare Life Sciences).

Inicialmente, os precipitados resultantes da etapa de expressão passaram por um processo de preparação, para então serem aplicados nas colunas. Os precipitados foram retirados do freezer para descongelamento e, em seguida, foram adicionados aproximadamente 25 mL de tampão de ligação (ver Tabela 1), 200 µL de inibidor de serino protease PMSF (1 mg/mL), 200 µL de Lisozima (1 mg/mL) e 200 µL de Dnase (1 mg/mL). Após homogeneização, as células do precipitado foram lisadas com o auxílio do sonicador (Branson Sonifier 450) por aproximadamente 10 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm por 50 minutos. O precipitado resultante do processo de lise foi descartado e o sobrenadante, ou lisado, foi utilizado na purificação.

A coluna de afinidade foi previamente equilibrada com aproximadamente 30 mL (ou 6 volumes de coluna) de tampão de ligação. O lisado resultante da última etapa de centrifugação foi aplicado na coluna HiTrap, seguindo-se com o processo de eluição em que foi realizado um gradiente de concentração de 0-100% do tampão (Tabela 1). O

eluído proveniente da afinidade foi concentrado até um volume aproximado de 2 mL utilizando-se o concentrador Millipore Sigma UFC901024 Amicon® Ultra-15.

Para a cromatografia de gel filtração, a coluna foi previamente equilibrada com 120 mL de tampão (ou 1 volume de coluna) (Tabela 1). Em seguida, a amostra concentrada foi aplicada na coluna, seguindo-se com a eluição da proteína. Após as etapas cromatográficas, foi realizado o SDS-PAGE (Laemmli, 1970) com gel de poliacrilamida 15% e coloração com Coomassie Brilliant Blue para verificar a massa molecular e pureza das proteínas.

Tabela 1– Tampões utilizados nas etapas de purificação.

Proteína	Tampão Ligação (A)	Tampão Eluição (B)	Tampão Gel Filtração
B1EPH2	50 mM HEPES pH8,0 300 mM NaCl 10% glicerol	A + 500 mM Imidazol	50 mM HEPES pH8,0 300 mM NaCl
TrEH	50 mM Tris-HCl 500 mM NaCl 50 mM Imidazol pH7,5	A + 300 mM Imidazol	50 mM Tris-HCl pH7,5 500 mM NaCl 10% glicerol
Lsd19 E197D	50 mM HEPES pH8,0 300 mM NaCl 10% glicerol	A + 500 mM Imidazol	50 mM HEPES pH8,0 300 mM NaCl
TsnB	50 mM HEPES pH8,0 200 mM NaCl	A + 500 mM Imidazol	50 mM HEPES pH8,0 200 mM NaCl

3) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X

A técnica de cristalização utilizada no presente trabalho foi a difusão de vapor (Forsythe *et al.*, 2002; Rhodes, 2006), por meio de dois métodos distintos, o método de gota sentada ou “*sitting drop*” e o método de gota suspensa ou “*hanging drop*”. Em ambos os métodos, volumes iguais de proteína concentrada foram misturados com

diferentes soluções precipitantes, permitindo a difusão de vapor entre a gota e a solução do poço. A Figura 12 apresenta um esquema de cada um dos métodos utilizados na etapa de cristalização e os detalhes na montagem das placas.

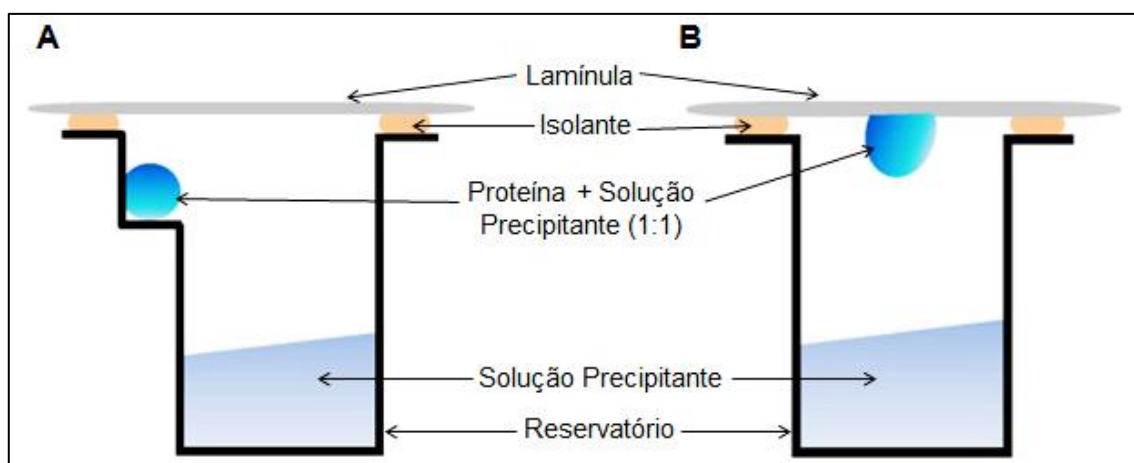


Figura 12– Esquema representando os diferentes métodos de cristalização por difusão de vapor. **A)** Método de cristalização gota sentada ou “*sitting drop*”. **B)** Método de cristalização gota suspensa ou “*hanging drop*”. Fonte: figura elaborada pelo autor.

Após a purificação, as proteínas foram concentradas e submetidas aos ensaios de cristalização. Os screenings iniciais foram realizados pelo método de gota sentada em placas de 96 poços (Hampton Research) utilizando-se os kits de cristalização Crystal Screen, Crystal Screen 2, PEGRx 1/2, Classic, Basic, JCSG e JBScreen Wizard (Hampton Research e Jena Bioscience), sendo o volume final das gotas de 0,6 µl com a proporção de 1:1, com 0,3 µl proteína e 0,3 µl da solução de cristalização. Essa etapa foi executada na Facilitie ROBOLAB do Lnbio – CNPEM, Campinas, SP e no nosso laboratório com o auxílio do robô Oryx 4 (Douglas Instruments, UK). Após a montagem das placas, as mesmas foram mantidas sob temperatura constante de 18°C.

Após a obtenção dos hits, foi realizado o refinamento manual das condições de cristalização a fim de se obter cristais de qualidade adequada para a coleta de dados de

raios-X. Cristais ideais para a difração apresentaram maior tamanho e formas mais definidas. Para isso, foram alterados os parâmetros químicos que influenciam a cristalização como pH, força iônica, concentração dos precipitantes e fatores físicos como o volume das amostras de proteína e solução do poço e temperatura. Além desses parâmetros, foram adicionados diferentes ligantes às amostras proteicas, método conhecido como co-cristalização. A B1EPH2 foi co-cristalizada com os epóxidos *cis*-2,3-epoxibutano; *trans*-2,3-epoxibutano; 1,2-epoxioctano; *exo*-2,3-epoxinorbornano; óxido de estireno; óxido de 1,4-ciclohexeno; óxido de ciclopenteno; óxido de ciclohexeno; *trans*-1,2-epoxilimoneno; fenil-glicidil-éter; butil-glicidil-éter e fosfomicina, todos na concentração de 5 mM. A TrEH foi co-cristalizada com valpromida e óxido de estireno (10 mM). Para a Lsd19 foi utilizado o substrato lasalocida (10 mM) e a TsnB foi co-cristalizada com glicidil-butil-éter; *trans*-2,3-epoxibutano; *cis*-2,3-epoxibutano e 1,2-epoxioctano (10 mM).

O refinamento foi realizado pelo método gota pendurada em placas Linbro® de 24 poços. Foi utilizado o volume de 400 µL de solução de cristalização por poço e cada gota apresentou o volume total de 2 µL na relação 1:1, com 1 µl de proteína e 1 µl do ligante associado à solução de cristalização. Após a montagem, as placas foram mantidas em sala climatizada com temperatura constante de 18°C. As placas contendo a Lsd19 E197D foram montadas em duplicatas para serem mantidas sob temperaturas diferentes, 18°C e 4°C. As placas foram analisadas com o auxílio de microscópio estereoscópico a partir de 24 horas após a montagem para acompanhar a formação dos cristais.

Após a obtenção dos cristais otimizados das proteínas do presente estudo, os mesmos foram levados ao síncrotron para a coleta dos dados de difração de raios-X. Na linha MX2/LNLS, Campinas – Brasil foram coletados os dados dos cristais da B1EPH2. Os dados referentes aos cristais da TrEH, Lsd19 E197D e TsnB foram coletados na linha PETRA-III/DESY, Hamburgo – Alemanha.

4) Determinação Estrutural

O processamento dos dados obtidos nas coletas foi realizado com o auxílio do programa XDS (Kabsch, 2010) e o escalonamento feito a partir do programa Aimless (Evans e Murshudov, 2013) do pacote CCP4i (Winn *et al.*, 2011). O número de moléculas da unidade assimétrica foi calculado utilizando-se o programa Matthews Coefficient (Kantardjieff e Rupp, 2003) também do pacote CCP4i (Winn *et al.*, 2011).

Todas as estruturas foram resolvidas por substituição molecular utilizando-se o programa Phaser (Mccoy *et al.*, 2007; Evans e Mccoy, 2008). Os ajustes do modelo de densidade eletrônica foram feitos com o auxílio do software COOT (Emsley *et al.*, 2010) e o refinamento das estruturas com o programa phenix.refine (Afonine *et al.*, 2012) do pacote PHENIX (Terwilliger *et al.*, 2009).

As figuras e sobreposições das estruturas foram feitas com o auxílio do software PyMOL Molecular Graphics System, Versão 1.8 Schrödinger, LLC e as análises de sequências de similaridades entre as estruturas foi realizada com o auxílio do servidor Dali Database (Holm e Rosenström, 2010). As análises das cavidades dos sítios ativos das enzimas foram realizadas pelo servidor POCASA (Yu *et al.*, 2010).

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Epóxido Hidrolase B1EPH2

a) Purificação

Após a expressão, a B1EPH2 foi submetida à cromatografia de afinidade que está representada pelo cromatograma da Figura 13A. De acordo com a figura, pode-se observar que o perfil cromatográfico apresentou dois picos distintos, EL1 e EL2, eluídos a partir do volume de 125 mL (25 volumes de coluna) nas concentrações de 10 e 15%, respectivamente, do tampão de eluição à 500 mM. A Figura 13B apresenta o SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue proveniente das frações obtidas nessa etapa de purificação. No gel, a proteína aparece pura e sem bandas contaminantes nos dois picos e com massa molecular de aproximadamente 37 kDa.

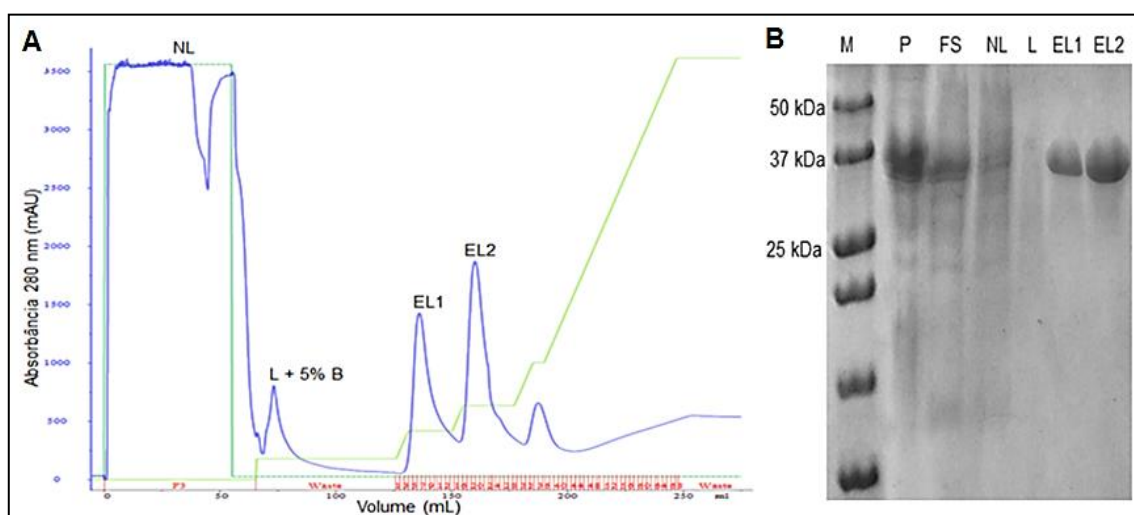


Figura 13– Cromatografia de Afinidade da B1EPH2. **A)** Cromatograma resultante. NL= Não- Ligado; L + 5% B= Lavagem do não-ligado com 5% do tampão de eluição; EL1 e EL2= Picos resultantes do processo de eluição. **B)** SDS-PAGE das frações obtidas na cromatografia. M= Marcador (kDa); P= Pellet; FS= Fração Solúvel; NL= Não- Ligado; L= Lavagem do não-ligado com 5% do tampão de eluição; EL1 e EL2= Picos resultantes do processo de eluição.

A B1EPH2 e as demais enzimas do presente estudo foram clonadas com a adição de uma cauda de histidina adicionada na região C ou N-terminal. A His-tag, a qual apresenta por volta de seis resíduos e acrescenta 1 kDa ao peso molecular final da enzima, é indispensável ao processo de purificação por afinidade por níquel. Nos experimentos aqui descritos, a coluna utilizada possui uma matriz sólida composta por íons de níquel imobilizados com grupamentos expostos. A afinidade é proveniente de ligações reversíveis formadas entre o íon metálico da matriz (o centro de adsorção) e o nitrogênio do grupamento imidazol presente na cauda de histidina, que doa elétrons para o Ni^{2+} . Durante o processo de eluição, a dessorção se deu pelo uso do agente competidor imidazol, que possui maior afinidade pelo sítio de ligação que a molécula que está adsorvida (Porath *et al.*, 1975; Sulkowski, 1989; Chaga, 2001). O gradiente de imidazol permitiu o aumento da força iônica e, dessa forma a dessorção da proteína para o meio em uma determinada concentração. Esse método necessita da introdução de mais uma etapa subsequente para eliminar o imidazol, no caso a cromatografia de gel filtração ou diálise (Bresolin *et al.*, 2009). Não foi realizada a clivagem da cauda de histidina após essa etapa de purificação.

Após o processo de purificação por afinidade, foi feito um pool dos picos resultantes da eluição e a B1EPH2 foi concentrada e submetida à purificação por gel filtração analítica para verificação do peso molecular e do estado oligomérico da enzima, além da retirada do imidazol proveniente da afinidade. A Figura 14 apresenta o cromatograma correspondente ao perfil de eluição da enzima utilizando-se uma coluna Superdex 200 (16/60). A curva em azul apresenta a B1EPH2, em que pode-se observar que a eluição ocorreu volume de retenção de 60 mL. Através da calibração da coluna

com proteínas com peso molecular conhecido e análise de regressão linear, pôde-se confirmar que a proteína eluiu como um hexâmero. Em relação ao estado oligomérico da enzima apresentado pela gel filtração, não foram encontradas referências na literatura de outras epóxido hidrolases hexaméricas. A curva em vermelho apresenta os picos das proteínas com pesos moleculares conhecidos utilizadas como padrão para calibração da coluna. A ferritina (440 kDa) apresenta volume de retenção de 53,90 mL; a aldolase (158 kDa) elui em 65,64 mL; a conalbumina (75 kDa) elui em 74,13 mL; a ovalbumina (43 kDa) elui em 79,59 mL e a anidrase carbônica (30 kDa) elui em 88,22 mL.

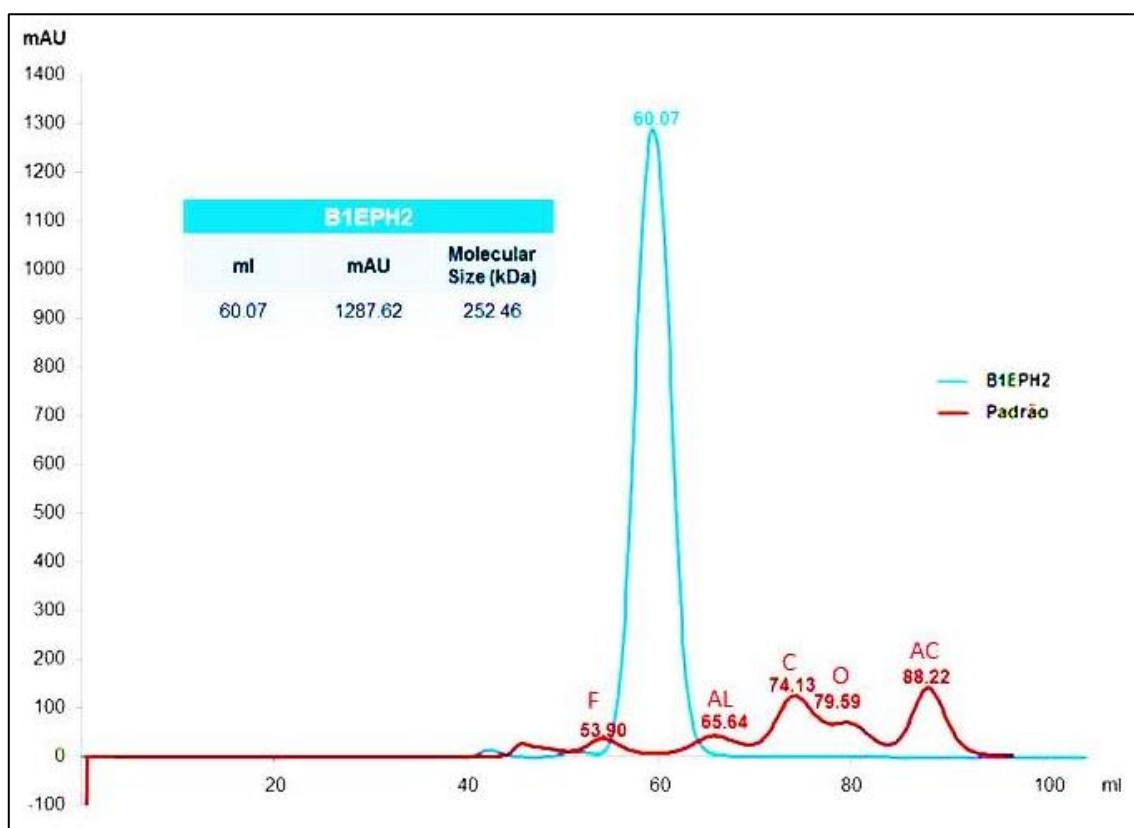


Figura 14– Cromatografia de Gel Filtração Analítica da B1EPH2. A curva em azul corresponde ao volume de retenção da B1EPH2. A curva em vermelho apresenta os picos das proteínas com pesos moleculares conhecidos utilizadas como padrão para calibração da coluna. F= ferritina, AL= aldolase, C= conalbumina, O= ovalbumina, AC= anidrase carbônica.

b) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X

As condições de cristalização da B1EPH2 estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2– Condições de cristalização da B1EPH2.

B1EPH2	
Concentração Proteína	10 mg/mL
Kit	JBScreen Wizard
Condição Inicial (“hits”)	0,1 M de cacodilato de sódio pH 6,5 1 M de citrato de tri-sódio
Condição Refinamento	0,1 M de cacodilato de sódio pH 7,35 0,7 M de citrato de tri-sódio
Co-cristalização	<i>cis</i> -2,3-epoxibutano; <i>trans</i> -2,3-epoxibutano; fenil-glicidil-éter e butil-glicidil-éter
Período Crescimento	3-4 dias
Temperatura	18°C

Os cristais (Figura 15A) difrataram a uma resolução de 2.37Å e pertencem ao grupo espacial tetragonal $P 4_1 2 2$. O padrão de difração de raios-X aparece representado na Figura 15B. Não foram utilizados crioprotetores, pois após diversos testes verificou-se que esses compostos impossibilitaram a difração dos cristais.

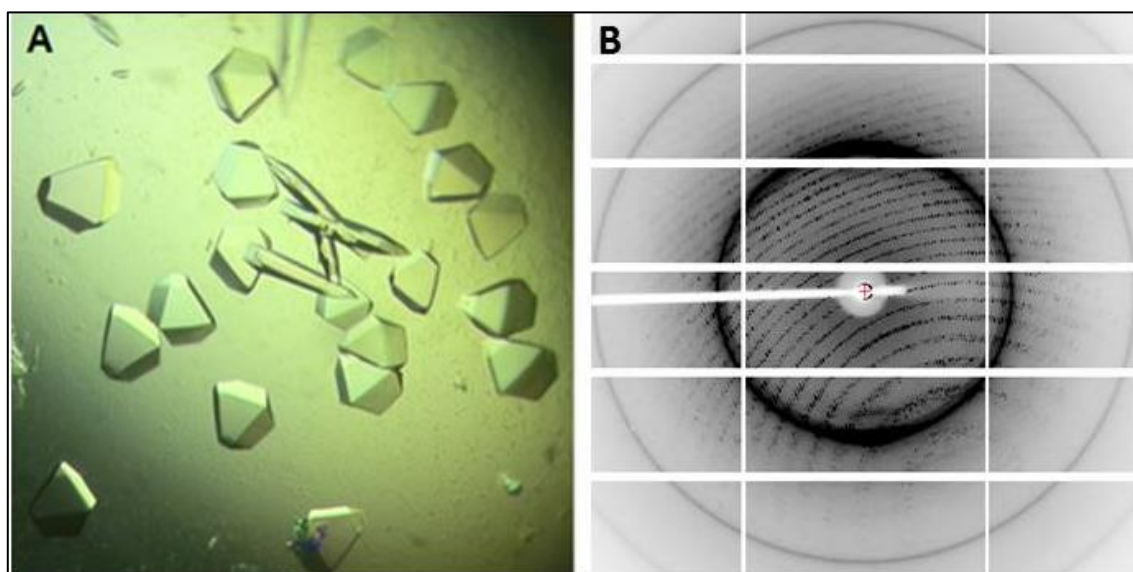


Figura 15– Cristalização e Difração de Raios-X da B1EPH2. **A)** Cristais com valpromida visualizados em microscópio estereoscópico com aumento de 80X. **B)** Imagem de difração de raios-X.

A estrutura da B1EPH2 foi resolvida a partir da substituição molecular utilizando como modelo a epóxido hidrolase de *Mycobacterium tuberculosis* (PDB 2E3J) (Gomez *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2011), sendo que ambas apresentam identidade de aproximadamente 49%. A estrutura final apresentou três protômeros na unidade assimétrica com 938 resíduos (cerca de 330 por monômero) e 217 moléculas de água com R_{factor} e R_{free} finais de 18,9% e 24,1%, respectivamente. Os dados de raios-X e estatísticas cristalográficas da B1EPH2 encontram-se sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3– Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da B1EPH2.

B1EPH2	
Fonte de Raios-X/ Comprimento de Onda (Å)	MX2/1.45
Resolução (Å)	49.05 – 2.37
Grupo Espacial	P 4 ₁ 2 2
Célula Unitária	107.890 107.890 235.79 90 90 90
Reflexões Totais	52543
Reflexões Únicas	9730 (3689)
Multiplicidade	5.4
Completeza (%)	99.42 (98.45)
I/sigma(I)	10.11 (2.52)
R-merge	0.198 (0.453)
R-work (%)	0.1891
R-free (%)	0.2411
Resíduos	938
RMS Ligações/ Ângulos	0.009/1.34
Ramachandran Favorável/ Permitido/ Outliers (%)	96/3.56/ 0.44

c) Determinação Estrutural

Apesar da estrutura final ter apresentado três protômeros na unidade assimétrica, a formação de um hexâmero pode ser obtida através de uma operação de simetria do cristal P 4₁ 2 2 corroborando com os resultados obtidos na gel filtração analítica da B1EPH2 (Figura 14). A Figura 16 apresenta a estrutura quaternária hexamérica da B1EPH2 (i) e as diferentes interfaces de dimerização realizada pelos protômeros (ii). As

superfícies dos protômeros B/A, F/C e D/E apresentam área aproximada de $440\text{\AA}^2$, 12 ligações de hidrogênio e um total de 14 interações iônicas, apresentando um padrão de dimerização semelhante a de *Mycobacterium tuberculosis* (Biswal et al., 2008). Já as interfaces entre os protômeros C/B, E/F e A/D possuem uma área de aproximadamente $467\text{\AA}^2$, 9 ligações de hidrogênio, um total de 10 interações iônicas e com um padrão de dimerização diferente de outras sEH conhecidas. As áreas das superfícies de dimerização foram calculadas com o auxílio do programa PISA (Krissinel e Henrick, 2007).

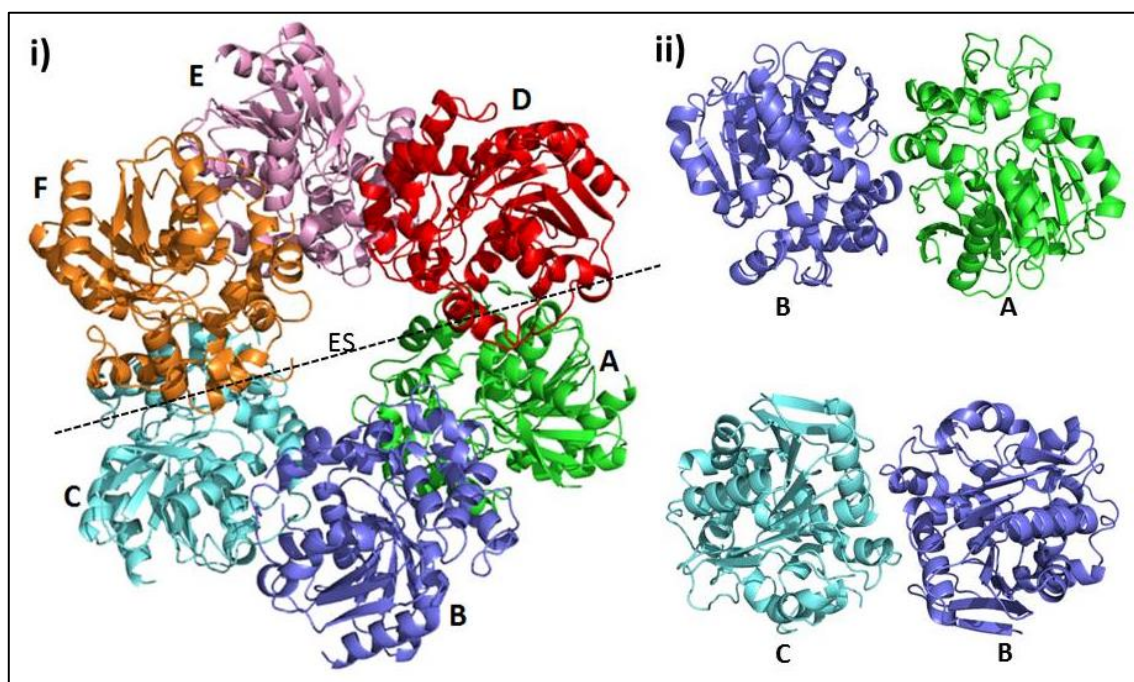


Figura 16– Estrutura quaternária da B1EPH2. **i)** Hexâmero com os protômeros indicados pelas letras A-F e cores distintas; **ii)** Tipos diferentes de superfícies de dimerização presentes no hexâmero. ES= eixo de simetria.

A B1EPH2 apresentou o enovelamento característico de outras Epóxido Hidrolases solúveis (sEH) com estruturas já resolvidas, sendo constituída por dois domínios, o domínio α/β hidrolase e o domínio cap (Argiriadi *et al.*, 1999). O domínio α/β hidrolase é topologicamente conservado em todas as epóxido hidrolases clássicas e

é composto por uma β -folha formada por oito fitas retorcidas, sendo as duas primeiras antiparalelas e as demais são arranjadas paralelamente. Além disso as fitas da β -folha são intercaladas por cinco α -hélices, sendo duas de um lado e três do lado oposto. O domínio cap é constituído apenas por α -hélices, assim como as demais EHs clássicas, porém essa região é altamente variável e é responsável pelo reconhecimento do substrato. Esse domínio apresenta sete α -hélices e extensos loops que tornam essa região mais flexível que o domínio hidrolase, podendo inclusive apresentar mudanças conformacionais quando liga-se ao substrato. Além das α -hélices e β -folha, estão presentes outras hélices menores (η) de conformação intermediária, com um número reduzido de resíduos (7 a 12) (Toniolo e Benedetti, 1991) (Figura 17).

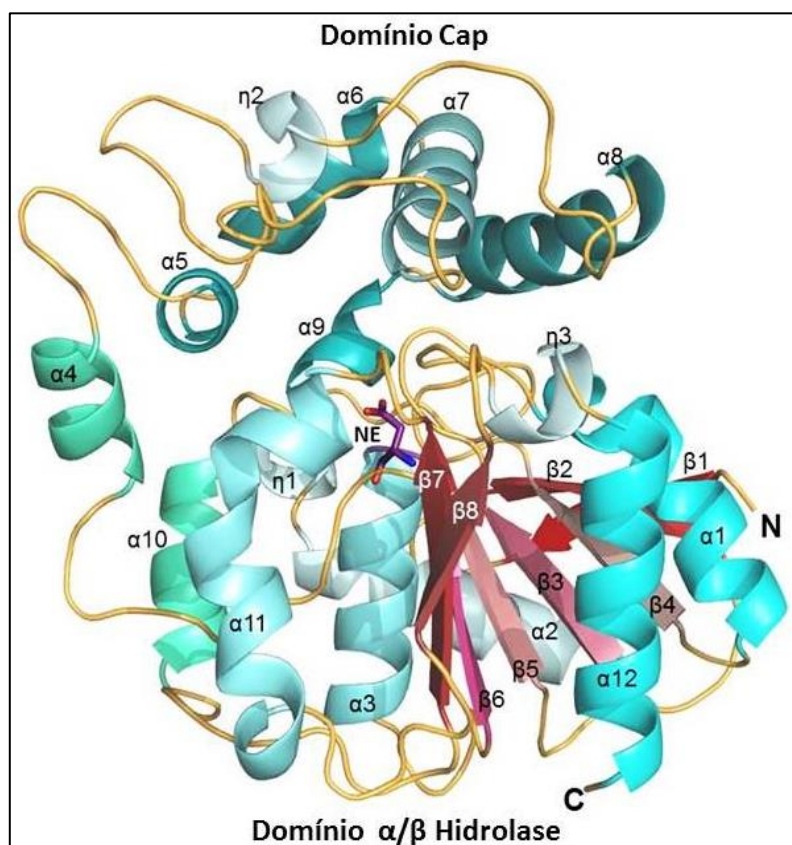


Figura 17– Estrutura tridimensional da B1EPH2. O domínio cap está apresentado em verde (α -hélices). O domínio α/β -hidrolase está apresentado em vermelho (β -folha) e ciano (α -hélices). As 3_{10} -hélices (η) estão em cinza e os loops em laranja. NE=Nucleophilic Elbow (resíduo Asp104 em violeta).

O sítio ativo da B1EPH2 está localizado em um sulco com aproximadamente 30Å entre os domínios cap e hidrolase, sendo constituído por resíduos de ambos os domínios. Além disso, como observado em outras sEH, a superfície eletrostática da B1EPH2 indica que a região mais profunda e a entrada da cavidade do sítio ativo são negativamente carregadas de modo similar à superfície da enzima que é predominantemente negativa. A Figura 18A apresenta a superfície eletrostática geral da B1EPH2, em que as cores vermelho, branco e azul representam as cargas negativa, neutra e positiva, respectivamente. A Figura 18B apresenta a superfície em corte vista sob ângulos opostos, onde destaca-se a cavidade do sítio ativo.

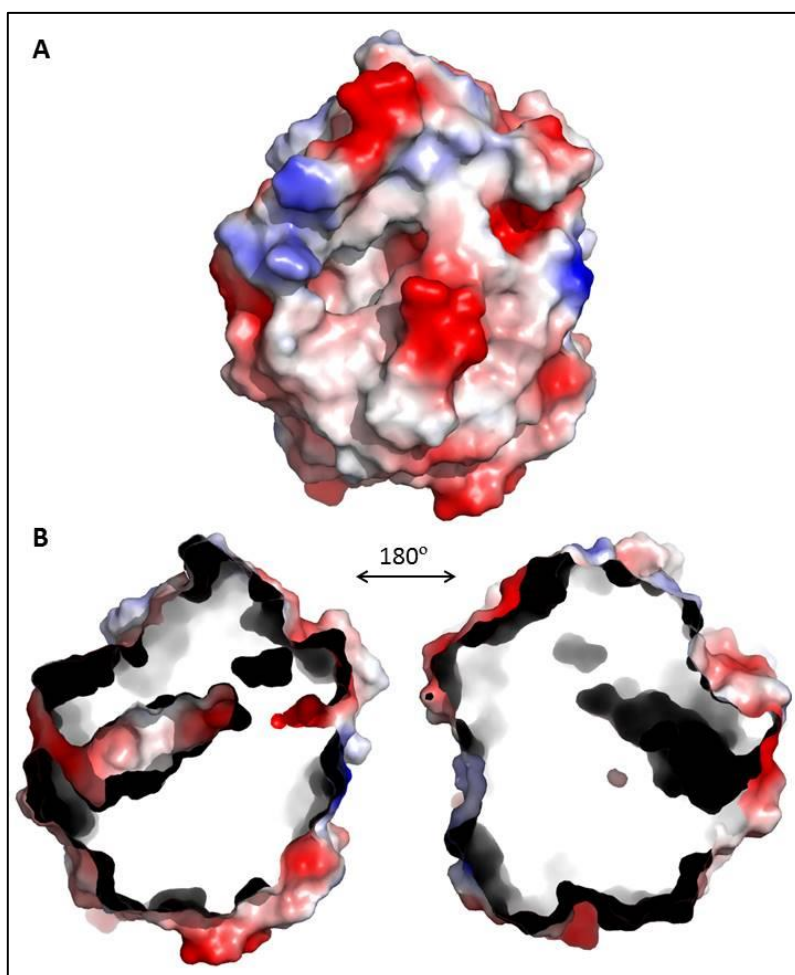


Figura 18– Superfície eletrostática da B1EPH2. **A)** Superfície geral mostrando as diferentes cargas. Azul= positiva; Branco= neutra; Vermelho= negativa. **B)** Superfície em corte.

Em relação aos resíduos que compõem o sítio ativo, a B1EPH2 apresenta a tríade catalítica conservada característica das α/β -hidrolases, que está localizada no domínio hidrolase. A tríade é constituída pelo Asp104 que forma o cotovelo nucleofílico ou “nucleophilic elbow”, um pequeno loop localizado entre $\beta 5$ e $\alpha 3$ no domínio hidrolase (Figura 17), a base geral His333 localizada no loop entre $\eta 3$ e $\beta 7$ e que se liga ao Asp302 (loop entre $\beta 6$ e $\alpha 11$) por interações de hidrogênio. Além disso, a B1EPH2 apresenta duas tirosinas conservadas Tyr164 e Tyr272 na hélice $\alpha 5$ e entre $\alpha 9$ e $\alpha 10$, respectivamente (domínio cap) que são responsáveis por orientar o oxigênio do grupo epóxido do substrato (Figura 17 e 19) e têm demonstrado serem essenciais para a atividade da enzima (Rink *et al.*, 2000). Os resíduos Asp302 e Glu38 são responsáveis por orientar a cadeia lateral da His333 para a ativação de uma molécula de água. O sítio ativo da B1EPH2 apresenta mais três aminoácidos importantes: a Phe36, o Trp105 e o Trp334 que são responsáveis por orientar a posição dos resíduos His333 e Tyr272 durante a catálise enzimática (Figura 19).

Foram realizados diversos experimentos visando a obtenção da estrutura da B1EPH2 em complexo com o inibidor de EH valpromida e os substratos epóxido *cis*-2,3-epoxibutano; *trans*-2,3-epoxibutano; 1,2-epoxioctano; *exo*-2,3-epoxinorbornano; óxido de estireno; óxido de 1,4-ciclohexeno; óxido de ciclopenteno; óxido de ciclohexeno; *trans*-1,2-epoxilimoneno; fenil-glicidil-éter; butil-glicidil-éter e fosfomicina. Entretanto, a análise do sítio ativo da B1EPH2 revelou a presença de uma densidade eletrônica que não corresponde a qualquer outro composto orgânico utilizado na preparação e cristalização da enzima. A identificação de inibidores ou análogos de substrato para essa enzima e, conseqüentemente a determinação da estrutura em

complexo com esses ligantes, é importante para a compreensão do funcionamento da mobilidade dos loops do domínio cap.

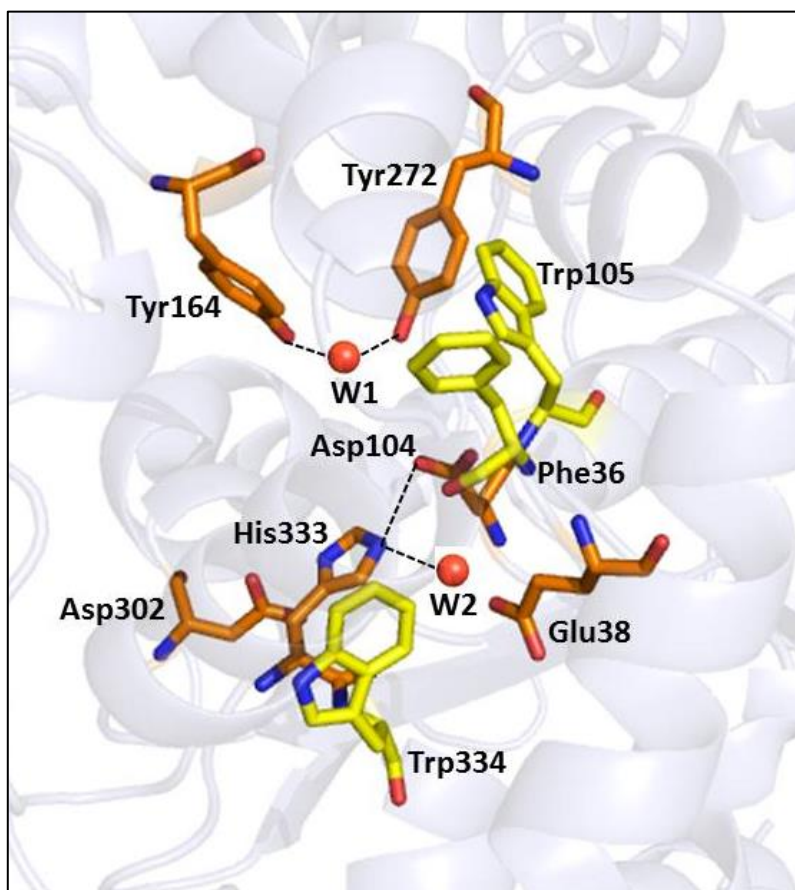


Figura 19– Resíduos do sítio ativo da B1EPH2. Os resíduos em laranja participam da catálise da enzima. Os resíduos representados em amarelo são responsáveis por orientar os resíduos catalíticos. W1 é a água que indica a posição do oxigênio do grupo epóxido e W2 é a água catalítica que é ativada pela His333.

De acordo com o Protein Data Bank, juntamente com os dados obtidos no Dali Database em relação ao PDB da B1EPH2, foi encontrada apenas uma estrutura resolvida de outra α/β -hidrolase pertencente ao gênero *Streptomyces sp*, porém com similaridade estrutural à B1EPH2 de apenas 11%. A estrutura pertence à EH de *S. carzinostaticus* e ainda não possui artigos publicados, apenas a estrutura depositada no banco de dados (PDB 5F4Z). Entretanto, conforme os valores obtidos pelo servidor Dali Database, os PDBs referentes às estruturas de *M. tuberculosis* (PDB 2E3J) (Biswal *et*

al., 2008), *Solanum tuberosum* (PDB 4UHB) (Mowbray *et al.*, 2006), roedor (PDB 1CQZ) (Argiriadi *et al.*, 1999) e humana (PDB 3ANS) (Gomez *et al.*, 2004) apresentaram, respectivamente, 49%, 38%, 35% e 36% de similaridade com a B1EPH2. Quando realizadas as sobreposições no Pymol da B1EPH2 com essas estruturas, o valor médio do rmsd foi de aproximadamente 0.80Å, indicando grande similaridade estrutural. O valor rmsd ou *Root-Mean-Square Distance* está relacionado ao grau de similaridade de duas estruturas tridimensionais de proteínas, que geralmente é medido entre pares de átomos equivalentes, sendo uma comparação quantitativa quando se sobrepõe duas estruturas. Quanto mais próximo de 0 for o valor de rmsd, mais semelhantes são as estruturas, sendo que esse parâmetro é medido em Ångström (Å) (Carugo e Pongor, 2001).

A Figura 20 apresenta a B1EPH2 de *Streptomyces wadayamensis* sobreposta à estrutura da EH de *Homo sapiens*. Na sobreposição geral das estruturas (Figura 20A), pode-se observar que o domínio α/β hidrolase se apresentou conservado e as diferenças mais nítidas entre elas estão presentes no domínio cap. A Figura 20B apresenta o cap das enzimas sobrepostas e as regiões em destaque compreendem os resíduos 194 à 247. A sEH humana (PDB 3ANS), em complexo com um inibidor (Tanaka *et al.*, 2011) e na forma de holoenzima (Gomez *et al.*, 2004), apresenta essa região do domínio cap na conformação fechada. Do mesmo modo, a B1EPH2 na forma de holoenzima apresentou a conformação do loop como “lid” fechado, sendo que apenas a estrutura dessa enzima em complexo com análogos de substrato ou ligantes pode responder à questão referente ao movimento de loop nessa região do sítio ativo e plasticidade da B1EPH2.

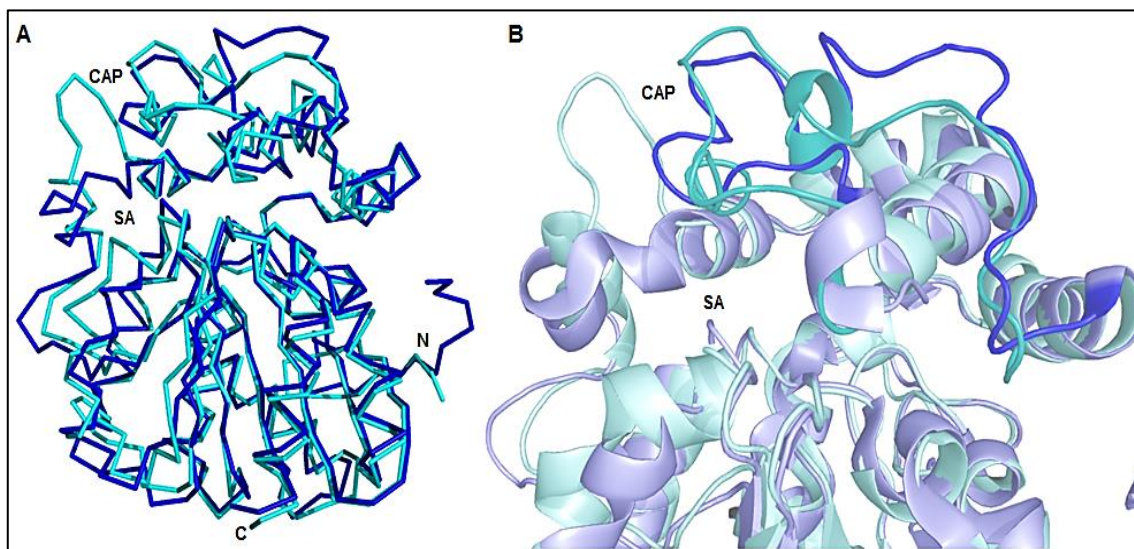


Figura 20– Estrutura da B1EPH2 sobreposta à sEH humana. **A)** Estrutura geral. **B)** Detalhe dos loops do domínio cap. B1EPH2 em ciano e *Homo sapiens* em azul. SA=sítio ativo.

Além da análise das estruturas referente às diferenças nas conformações dos loops que compõem o domínio cap e delimitam o sítio ativo, foi realizada a sobreposição dos resíduos do sítio ativo da B1EPH2 e das sEH humana, de batata e de *M. tuberculosis*. A Figura 21 apresenta a sobreposição dos resíduos catalíticos. A principal diferença observada está na sobreposição resíduos Trp334 da B1EPH2 com o resíduo Phe301 da EH de batata, sendo os únicos resíduos não conservados de acordo com as comparações realizadas. Apesar de não serem conservados, ambos os resíduos, Trp e Phe podem ser responsáveis pela orientação dos resíduos de His333 e His300 pertencentes à tríade catalítica. O sítio ativo das demais EHs apresentou-se altamente conservado, além dos resíduos apresentarem diferentes conformações e que podem estar envolvidos na especificidade do substrato ou na enantiosseletividade da enzima. Entretanto não podemos inferir com certeza a respeito da enantiosseletividade sem a cristalização da enzima na presença de substratos enantioméricos ou sem os dados

referentes aos testes enzimáticos (esses dados estão sendo trabalhados por um de nossos colaboradores).

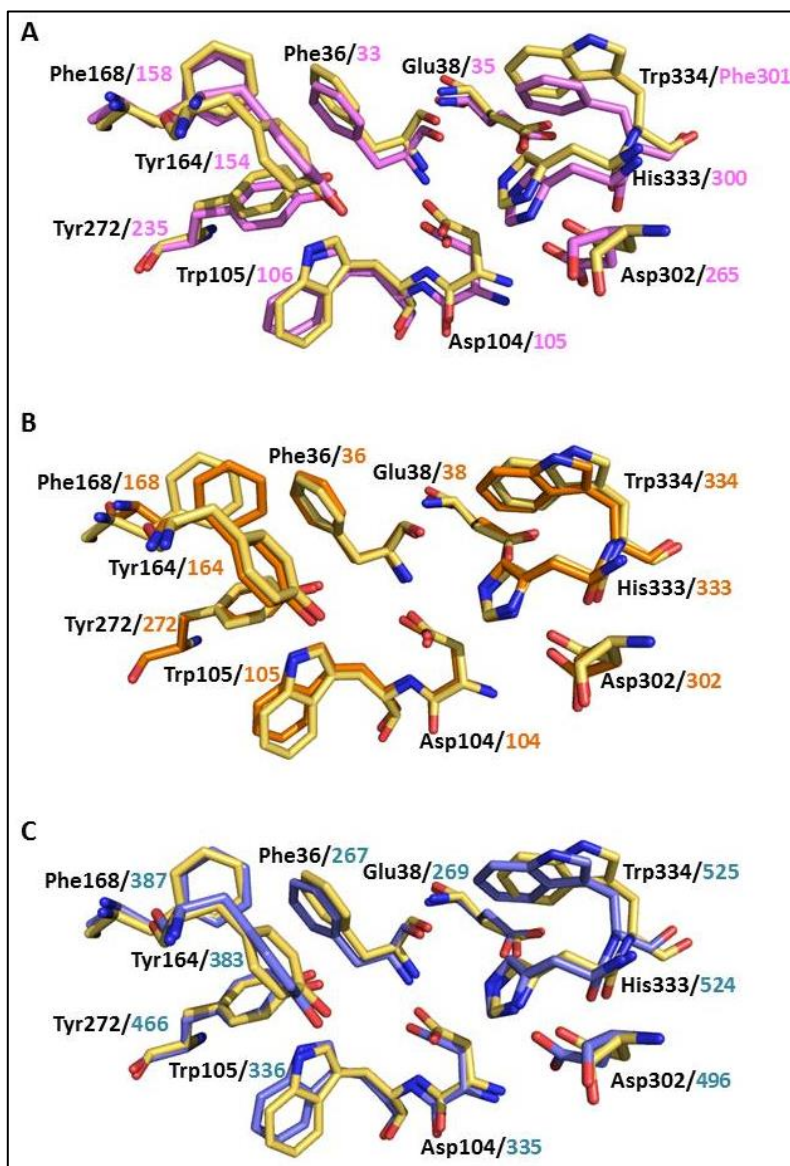


Figura 21– Sobreposição de resíduos do sítio ativo de diferentes EHs. Os resíduos da B1EPH2 estão representados em amarelo. **A)** Sobreposição entre B1EPH2 e EH de batata (rosa). **B)** Sobreposição entre B1EPH2 e EH de *M. tuberculosis* (laranja). **C)** Sobreposição entre B1EPH2 e EH humana (azul).

Em relação aos resíduos conservados do sítio ativo, pode-se inferir que a B1EPH2 possivelmente apresenta um mecanismo catalítico similar às outras sEH e que envolve um mecanismo S_N2 com duas etapas de reação para abertura e hidrólise do

grupo epóxido aos produtos dióis correspondentes. O Asp104 deve estar envolvido na primeira etapa da reação atacando o carbono do substrato epóxido para formar um intermediário covalente alquilenzima que é hidrolisado na etapa subsequente, que envolve a água ativada pela His333 (auxiliada pelo Asp302). Os resíduos Tyr164 e Tyr272 agem durante a protonação e o estado de transição para a formação do éster intermediário. De acordo com a literatura, a sEH de *Solanum tuberosum* apresenta preferência por substratos enantioméricos de configuração (S)-(-)(Monterde *et al.*, 2004). Como a B1EPH2 apresentou grande similaridade na sobreposição de resíduos do sítio ativo da sEH de batata (Figura 21A), pode ser um indicativo de que a enzima do presente estudo também apresente enantiopreferência por substratos de conformação (S)-(-).

2) Epóxido Hidrolase TrEH

a) Purificação

A etapa de purificação por afinidade foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo, sendo fornecida ao nosso grupo de pesquisa a proteína pura para que realizássemos a gel filtração analítica e os experimentos referentes à cristalização e análise estrutural da enzima. A Figura 22 apresenta o SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue realizado para verificação da pureza e peso molecular da TrEH. A proteína apresentou uma única banda sem contaminante e com peso molecular de aproximadamente 38 kDa.

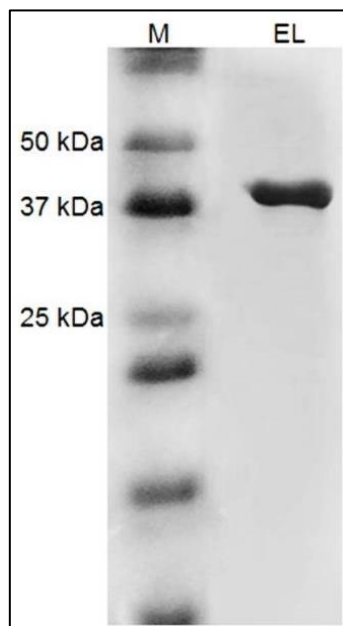


Figura 22– SDS-PAGE da cromatografia de afinidade da TrEH. O gel tem concentração de 15% e foi corado com Coomassie Blue. A proteína pura apresenta massa molecular de aproximadamente 38 kDa. M= marcador; EL= eluído.

A Figura 23 apresenta o cromatograma correspondente ao perfil de eluição da enzima utilizando-se a coluna Superdex 200 (16/60). A curva em azul apresenta a TrEH, em que pode-se observar que a mesma eluiu como um monômero no volume de retenção de 77,86 mL e uma pequena fração eluiu como um dímero no volume de retenção de 67,66 mL. De acordo com a literatura (Argiriadi *et al.*, 1999; Gomez *et al.*, 2004; Mowbray *et al.*, 2006; Biswal *et al.*, 2008), os mais diversos organismos possuem epóxido hidrolases solúveis diméricas, o que contrasta com a TrEH que apresentou-se predominantemente monomérica. A curva em vermelho apresenta os picos das proteínas com pesos moleculares conhecidos utilizadas como padrão para calibração da coluna. A ferritina (440 kDa) apresenta volume de retenção de 53,90 mL; a aldolase (158 kDa) elui em 65,64 mL; a conalbumina (75 kDa) elui em 74,13 mL; a ovalbumina (43 kDa) elui em 79,59 mL e a anidrase carbônica (30 kDa) elui em 88.22 mL.

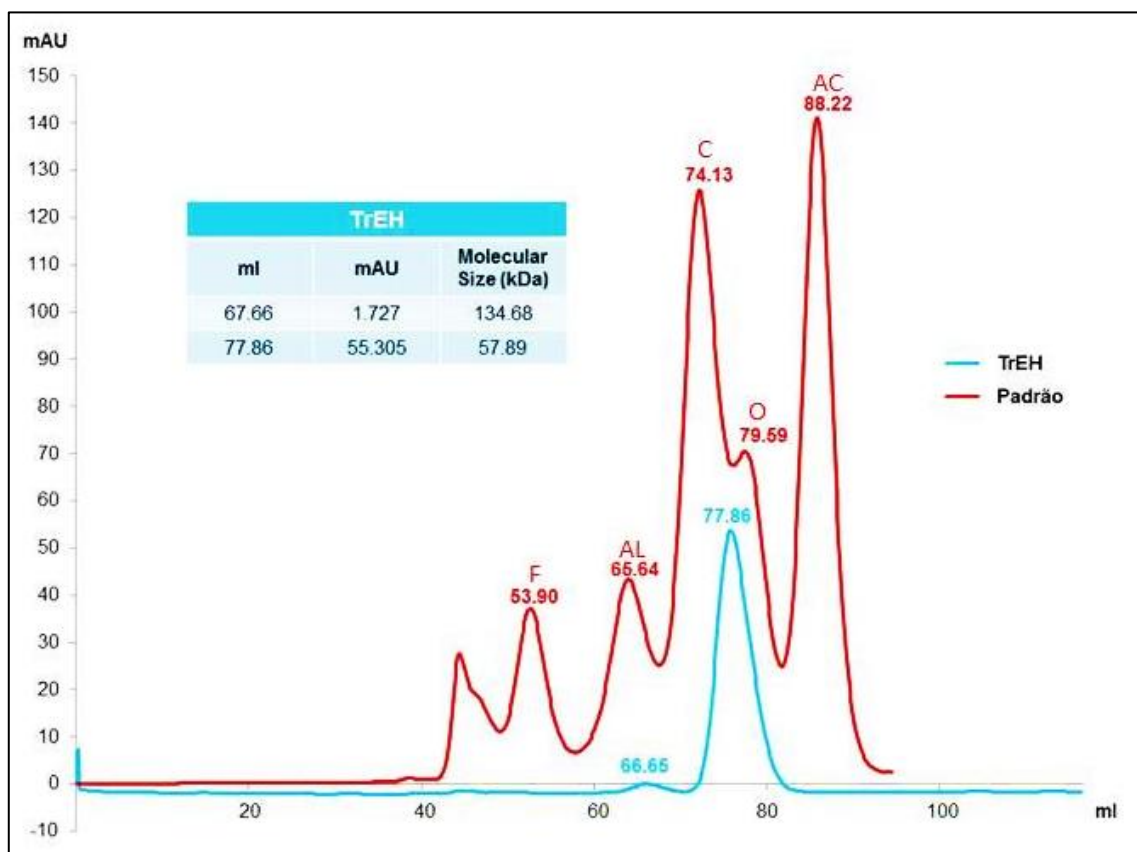


Figura 23– Cromatografia de Gel Filtração Analítica da TrEH. A curva em azul corresponde ao volume de retenção da TrEH. A curva em vermelho apresenta os picos das proteínas com pesos moleculares conhecidos. F= ferritina, AL= aldolase, C= conalbumina, O= ovalbumina, AC= anidrase carbônica.

b) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X

As condições de cristalização da TrEH estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4– Condições de cristalização da TrEH.

TrEH	
Concentração Proteína	13 mg/mL
Kit	Pi-minimal Screen HTS
Condição Inicial (“hits”)	44,6% PEG 4000
	150 mM MOPS pH 7,0
	40 mM Brometo de Potássio
Condição Refinamento	44,6% PEG 4000
	150 mM MOPS pH 6,5
	40 mM Brometo de Potássio
Co-cristalização	Valpromida e óxido de estireno
Período Crescimento	1-2 dias
Temperatura	18°C

Os cristais da TrEH (Figura 24A) difrataram à 1.70Å e pertencem ao grupo espacial ortorrômbico $P 2_1 2_1 2$. O padrão de difração de raios-X dos cristais aparece representado na Figura 24B. Para a difração não foram utilizados crioprotetores, já que o polietileno glicol (PEG) 4000 utilizado nas condições de cristalização possui propriedades de crioproteção.

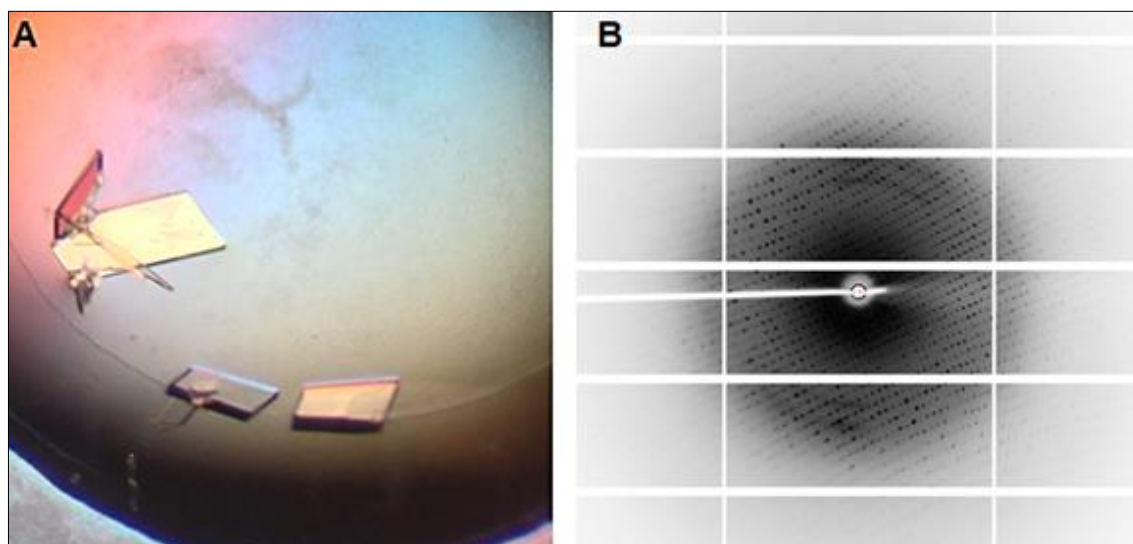


Figura 24– Cristalização e Difração de Raios-X da TrEH. **A)** Cristais com óxido de estireno visualizados em microscópio estereoscópico com aumento de 80X. **B)** Imagem de difração de raios-X.

A estrutura da TrEH foi resolvida a partir da substituição molecular utilizando como modelo o domínio C-terminal da epóxido hidrolase humana (PDB 3ANS) (Gomez *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2011), sendo que ambas apresentam identidade de aproximadamente 30%. A estrutura final da enzima apresentou um monômero na unidade assimétrica com 336 resíduos e 179 moléculas de água com R_{factor} e R_{free} finais de 18,3% e 21,1%, respectivamente. Os dados de raios-X e estatísticas cristalográficas da TrEH encontram-se sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5– Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da TrEH.

TrEH	
Fontes de Raios-X/ Comprimento de Onda (Å)	PETRA-III/ 0.975
Resolução (Å)	44.32 – 1.701 (1.762 – 1.701)
Grupo Espacial	P 21 21 2
Célula Unitária	51.427 78.281 87.372 90 90 90
Reflexões Totais	508661 (49133)
Reflexões Únicas	39388 (3812)
Multiplicidade	12.9 (12.9)
Completeza (%)	1.00 (0.99)
I/sigma(I)	26.58 (1.34)
R-merge	0.049 (1.48)
R-work (%)	0.1845 (0.3660)
R-free (%)	0.2125 (0.3924)
Resíduos	336
RMS Ligações/ Ângulos	0.007/ 1.07
Ramachandran Favorável/ Permitido/ Outliers (%)	97/ 2.1/ 0.6

c) Determinação Estrutural

A análise do empacotamento do cristal da TrEH pelo programa PISA (Krissinel e Henrick, 2007) indica que apenas uma pequena superfície putativa de interação entre dois protômeros adjacentes pode ser formada através de simetria do tipo 2. Esta interface de dimerização putativa tem uma área de cerca de $620\text{\AA}^2$ e apresenta diversas interações iônicas (15 no total), além de 15 ligações de hidrogênio. No entanto, esta interface é completamente diferente do que foi observado em outras sEHs e sugere que a TrEH pode ter um equilíbrio monômero/dímero em solução o que define uma nova estrutura quaternária para sEH (Figura 25). No entanto, outros experimentos são necessárias para elucidar a real existência do dímero ou o mesmo pode se tratar de um artefato produzido pela alta concentração de proteína usada durante os ensaios de cristalização.

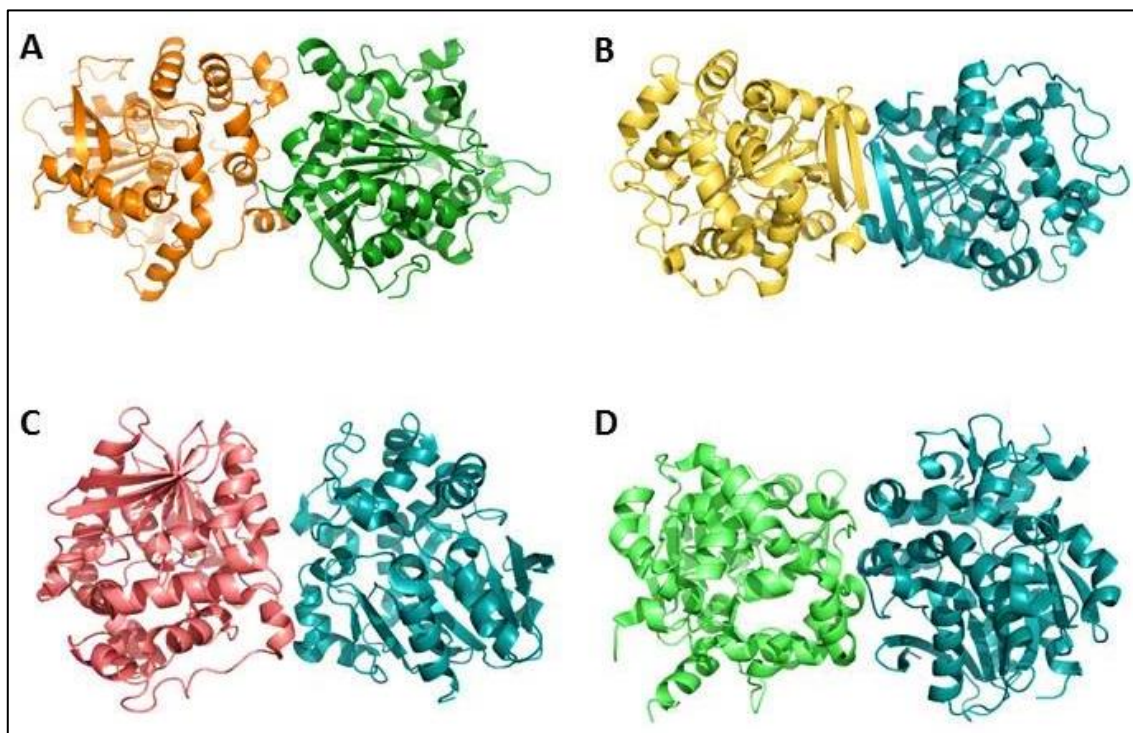


Figura 25– Interface de dimerização em diferentes sEH. **A)** TrEH. **B)** EH humana. **C)** EH de batata. **D)** EH de *Mycobacterium tuberculosis*.

A TrEH apresentou o fold característico de outras sEH com estruturas já resolvidas, sendo constituída por dois domínios, o domínio α/β hidrolase e o domínio cap (Argiriadi *et al.*, 1999). O domínio α/β hidrolase é composto por uma β -folha formada por oito fitas retorcidas, sendo as duas primeiras antiparalelas e as demais são arranjadas paralelamente. As fitas da β -folha são intercaladas por cinco α -hélices, sendo duas de um lado e três do lado oposto. O domínio cap é constituído por sete α -hélices e diversos loops, assim como as demais EHs clássicas (Figura 26).

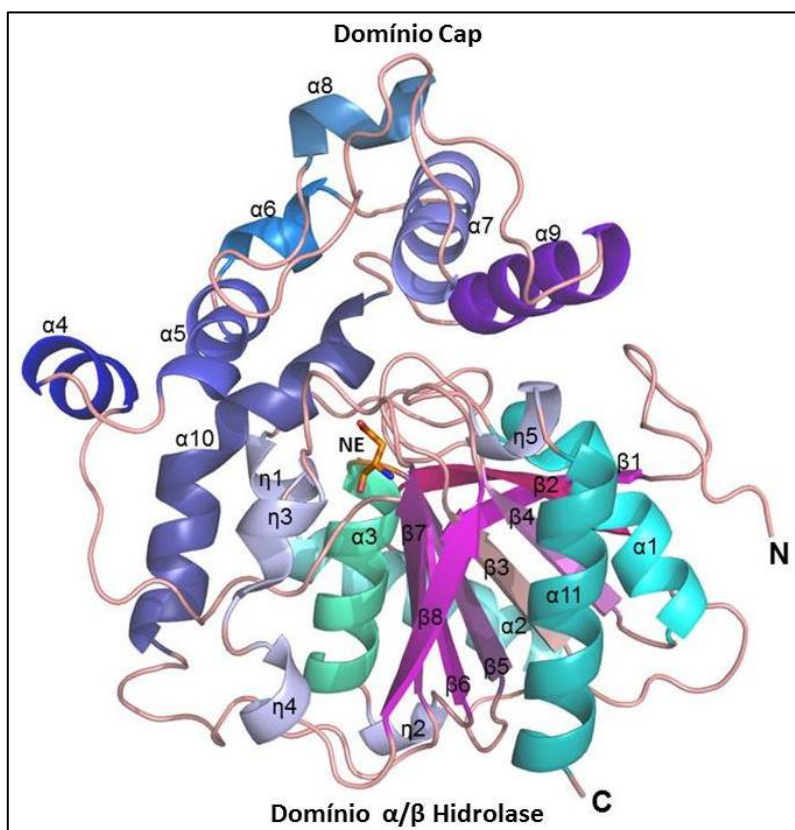


Figura 26– Estrutura tridimensional da TrEH. O domínio cap está em azul (α -hélices). O domínio α/β -hidrolase está apresentado em magenta (β -folha) e ciano (α -hélices). As 3_{10} -hélices (η) estão em cinza e os loops estão em rosa. NE= Nucleophilic Elbow (resíduo Asp116 em laranja).

O sítio ativo da TrEH está localizado em um sulco com aproximadamente 30Å entre os domínios cap e hidrolase, sendo constituído por resíduos de ambos os domínios (Figura 27). Além disso, como observado em outras sEH, a superfície eletrostática da TrEH indica que a região mais profunda do sítio ativo é negativamente carregada de modo similar à superfície da enzima que é predominantemente negativa, entretanto, diferente da maioria das EHs clássicas, a entrada da cavidade do sítio ativo é carregada positivamente. A Figura 27A apresenta a superfície eletrostática geral da TrEH, em que as cores vermelho, branco e azul representam as cargas negativa, neutra e positiva, respectivamente. A Figura 27B apresenta a superfície em corte vista sob ângulos opostos, onde destaca-se a cavidade do sítio ativo em forma de “L”.

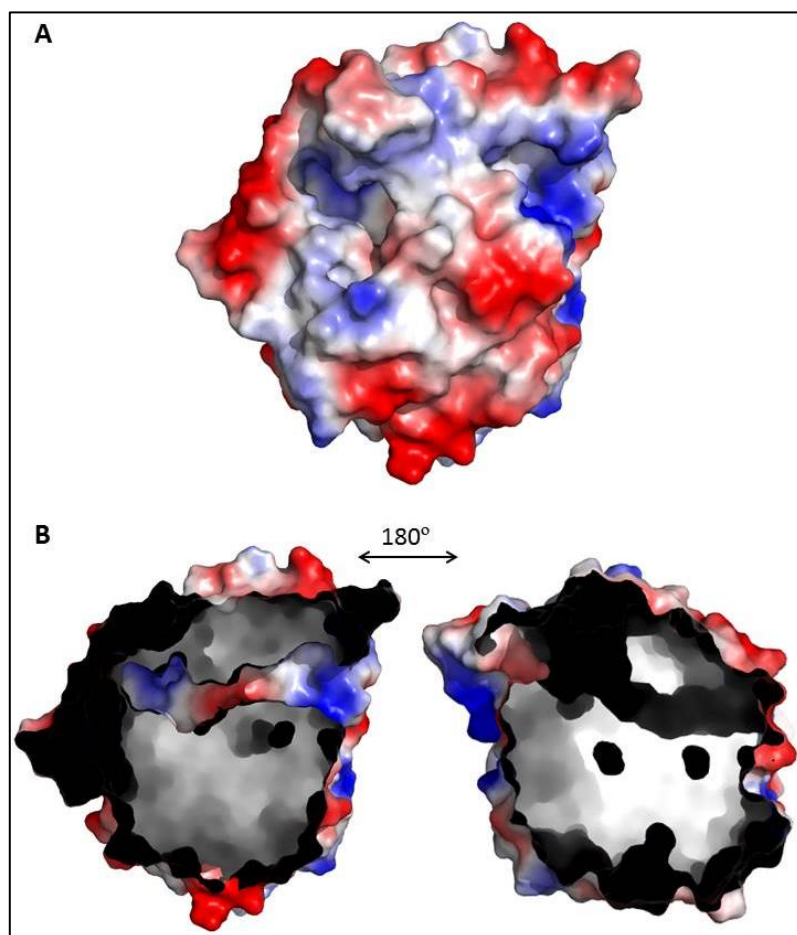


Figura 27– Superfície eletrostática da TrEH. **A)** Superfície geral mostrando as diferentes cargas. Azul= positiva; Branco= neutra; Vermelho= negativa. **B)** Superfície em corte para melhor visualização da cavidade catalítica.

Com relação aos resíduos do sítio ativo, a TrEH apresenta a tríade catalítica das epóxido hidrolases clássicas, que é formada pelo Asp116, que constitui o cotovelo nucleofílico (loop entre folha $\beta 5$ e hélice $\alpha 3$), a His313 localizada no loop entre $\beta 8$ e $\eta 5$ e o Asp286, localizado no loop entre $\beta 7$ e $\eta 3$. Além disso, a enzima apresenta dois resíduos conservados no domínio cap, as tirosinas Tyr167 e Tyr252 localizadas em $\alpha 5$ e $\alpha 10$, respectivamente, que são responsáveis por orientar o oxigênio do grupo epóxido do substrato (Figuras 26 e 28). Esses dois resíduos estão envolvidos na formação do oxiânion para o oxigênio do grupo epóxido do substrato e têm demonstrado serem essenciais para a atividade da enzima (Rink *et al.*, 2000). Foi observado que a molécula

de água na estrutura da TrEH deve estar localizada na mesma posição do oxigênio do grupo epóxido do substrato e faz interações de hidrogênio com ambos os resíduos de tirosina. Além disso, como observado em outras sEH, o sítio ativo também apresenta uma molécula de água conservada que deve agir como um nucleófilo durante o segundo passo da reação de hidrólise (Figura 28). Esta água faz interações de hidrogênio com a cadeia lateral da His313, que é ativada pelo ataque nucleofílico de um dos carbonos do grupo epóxido.

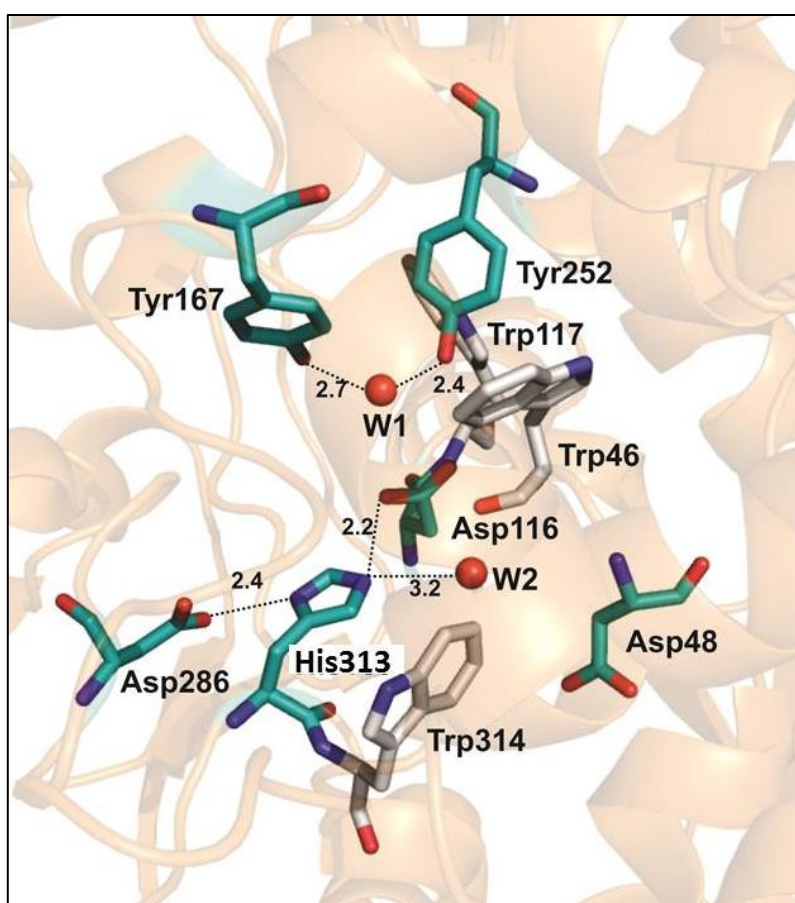


Figura 28– Resíduos do sítio ativo da TrEH. Os resíduos em ciano participam diretamente da catálise da enzima. Os triptofanos que estão representados na cor branca orientam os resíduos envolvidos na catálise. W1=molécula de água que indica a posição do oxigênio do grupo epóxido; W2=água catalítica que deve ser ativada pela His313.

A função do Asp286 é orientar a cadeia lateral da His313 para a ativação da molécula de água. Em outras estruturas a água interage com um segundo resíduo ácido, o glutamato, que também contribui para a orientação da histidina. Na TrEH o resíduo ácido é o Asp48 que possui um ângulo diferente e não interage com a água, apesar de sua posição permitir que ele sofra alterações conformacionais como consequência à ligação de substratos. O sítio ativo da TrEH apresentou três triptofanos adicionais (46, 117 e 314) que são conservados ou são substituídos por fenilalaninas em outras estruturas de sEH e deve apresentar um papel na orientação da posição da His313 e da Tyr252 durante a catálise da enzima.

Foram realizados diversos experimentos visando a obtenção da estrutura da TrEH em complexo com o inibidor de EH valpromida e o substrato epóxido óxido de estireno, entretanto, não foram obtidos dados de densidade eletrônica que permitissem a identificação clara desses ligantes. Entretanto, a análise do sítio ativo da TrEH revelou a presença de uma densidade eletrônica que não corresponde a qualquer outro composto orgânico utilizado na preparação e cristalização da enzima, incluindo o polietileno glicol que foi observado em outras estruturas de sEH e um possível ligante para essa família de enzimas (Figura 29). A densidade eletrônica com baixa ocupância pode ser proveniente de algum ligante co-purificado com a enzima e proveniente do extrato de *E. coli*. A identificação de inibidores ou análogos de substrato para essa enzimas e, consequentemente a determinação da estrutura em complexo com esses ligantes, é importante para a compreensão do funcionamento da mobilidade dos loops do domínio cap.

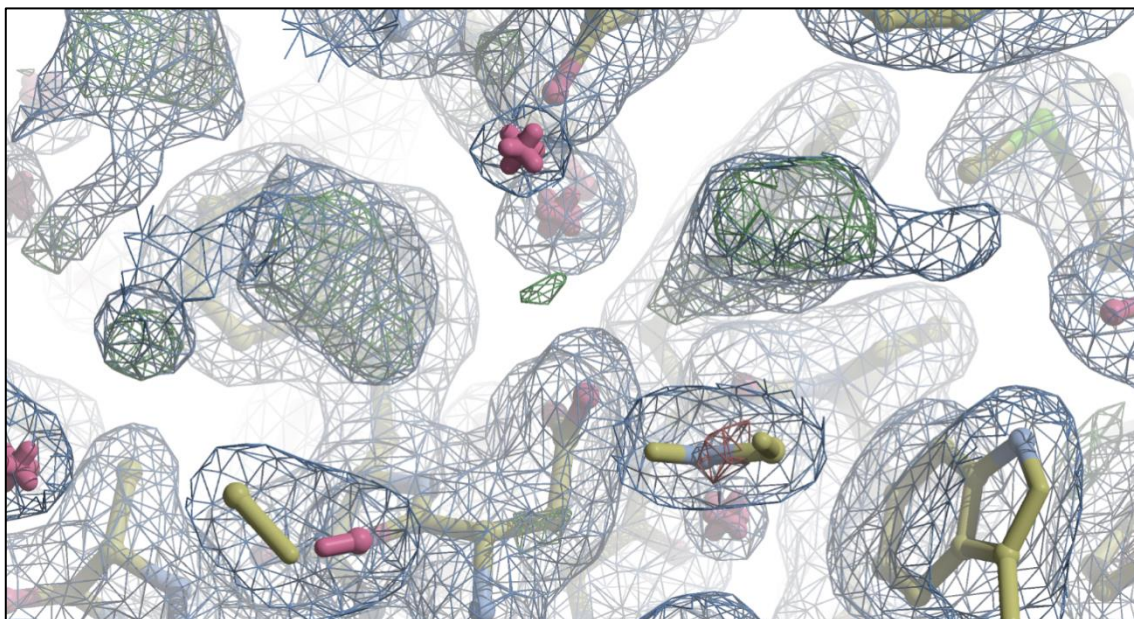


Figura 29– Mapa de densidade eletrônica do sítio ativo da TrEH. Em verde está o mapa Fo-Fc evidenciando a presença de uma densidade eletrônica difusa no sítio ativo que pode ser proveniente de ligantes presentes no extrato de *E. coli* durante o processo de purificação da TrEH; em azul está representado o mapa 2Fo-Fc.

Não foram encontradas na literatura estruturas resolvidas de outras sEH de fungos. A única EH fúngica estruturalmente caracterizada até o presente momento é a mEH de *Aspergillus niger* (Zou *et al.*, 2000). De acordo com o servidor Dali Database, a TrEH e a mEH de *A. niger* (PDB 1QO7) apresentam uma similaridade estrutural de 16% e, realizando uma sobreposição de ambas as estruturas no Pymol, o valor rmsd foi igual à 2.2Å demonstrando que, embora essas enzimas apresentem o mesmo enovelamento, elas são pouco similares. Devido à inexistência de trabalhos estruturais sobre sEH fúngicas e de *Trichoderma reesei* na literatura, depositamos no banco de dados a primeira estrutura resolvida da TrEH (PDB 5URO) e publicamos recentemente um trabalho de sua caracterização estrutural (ANEXO B) (Wilson *et al.*, 2017).

Quando realizadas as sobreposições da TrEH com as sEH de *M. tuberculosis* (Biswal *et al.*, 2008), batata (Mowbray *et al.*, 2006), roedor (Argiriadi *et al.*, 1999) e

humano (Gomez *et al.*, 2004), todas apresentaram um valor de rmsd de aproximadamente 1.6Å, indicando maior similaridade estrutural. De acordo com o servidor Dali Database, os PDBs referentes às estruturas da sEH humana (PDB 3ANS), de roedor (PDB 1CQZ), de *M. tuberculosis* (PDB 2E3J) e de batata (PDB 4UHB) apresentam, respectivamente, 30%, 29%, 23% e 20% de similaridade com a TrEH.

Com base na similaridade existente entre as estruturas citadas acima, o sítio ativo da TrEH não deve sofrer extensivas mudanças conformacionais. Apenas alguns ajustes na cadeia lateral podem ocorrer para um melhor posicionamento do substrato no sítio ativo durante a catálise. Em comparação com outras sEH, a TrEH apresenta um longo loop entre os resíduos 194 a 213, o que forma uma tampa ou “lid”, o que aparenta ser a conformação aberta da estrutura, já que a mesma foi obtida na forma de apoenzima. Já a sEH humana (PDB 3ANS), em complexo com um inibidor (Tanaka *et al.*, 2011) e na forma apoenzima (Gomez *et al.*, 2004), apresenta essa região do domínio cap que compreende os resíduos 194-247 na conformação fechada, como pode ser observado na Figura 30. Entretanto, apenas a estrutura da TrEH em complexo com substratos ou análogos de substrato pode responder à questão referente ao movimento de loop nessa região do sítio ativo e plasticidade da enzima.

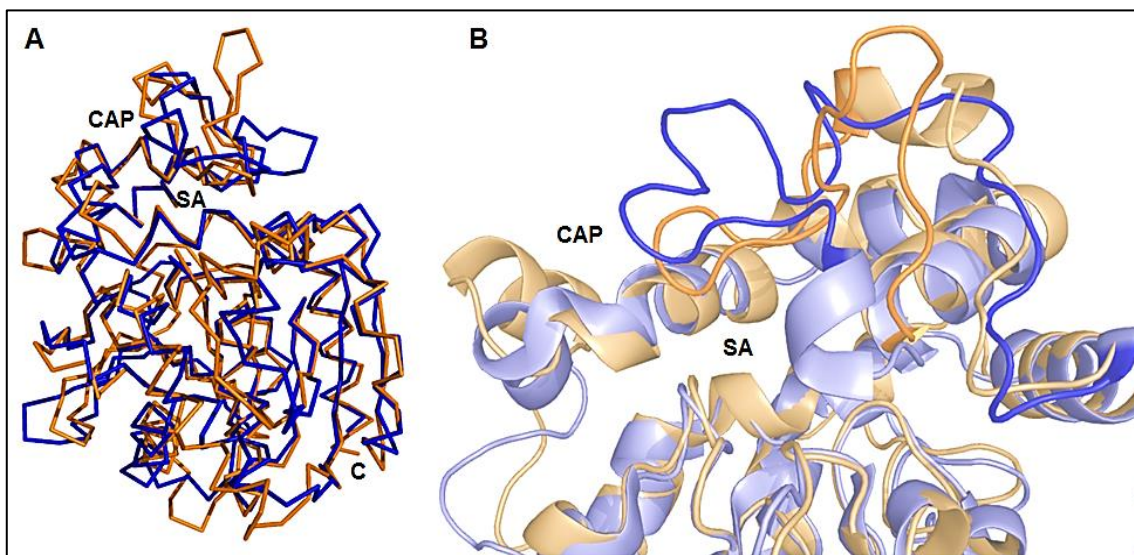


Figura 30— Estrutura da TrEH sobreposta à sEH humana. **A)** Estrutura geral. **B)** Detalhe dos loops do domínio cap. TrEH em laranja e *Homo sapiens* em azul. SA=sítio ativo.

Além da análise das estruturas referente às diferenças nas conformações dos loops que compõem o domínio cap e delimitam o sítio ativo, foi realizada a sobreposição dos resíduos do sítio ativo da TrEH e das sEH humana, de batata e de *M. tuberculosis*. Devido à baixa identidade da TrEH com as demais enzimas, o sítio ativo apresentou diversos resíduos que não são conservados ou que são conservados mas que apresentam diferentes conformações e que podem estar envolvidos na especificidade do substrato ou na enantiosseletividade da enzima. A Figura 31 apresenta a sobreposição dos resíduos catalíticos. Diferenças importantes foram observadas nos resíduos do domínio hidrolase. Como exemplo, os resíduos Trp46 e Leu171 da TrEH estão relativamente próximos do resíduo Tyr252 da tríade catalítica, sendo que nas demais sEH, esse resíduo é substituído por fenilalaninas conservadas. Um papel importante desses resíduos pode ser a orientação do posicionamento correto da Tyr252 ao interagir com o oxigênio do grupo epóxido do substrato e, conseqüentemente, apresenta algum efeito sobre a enantiosseletividade da TrEH.

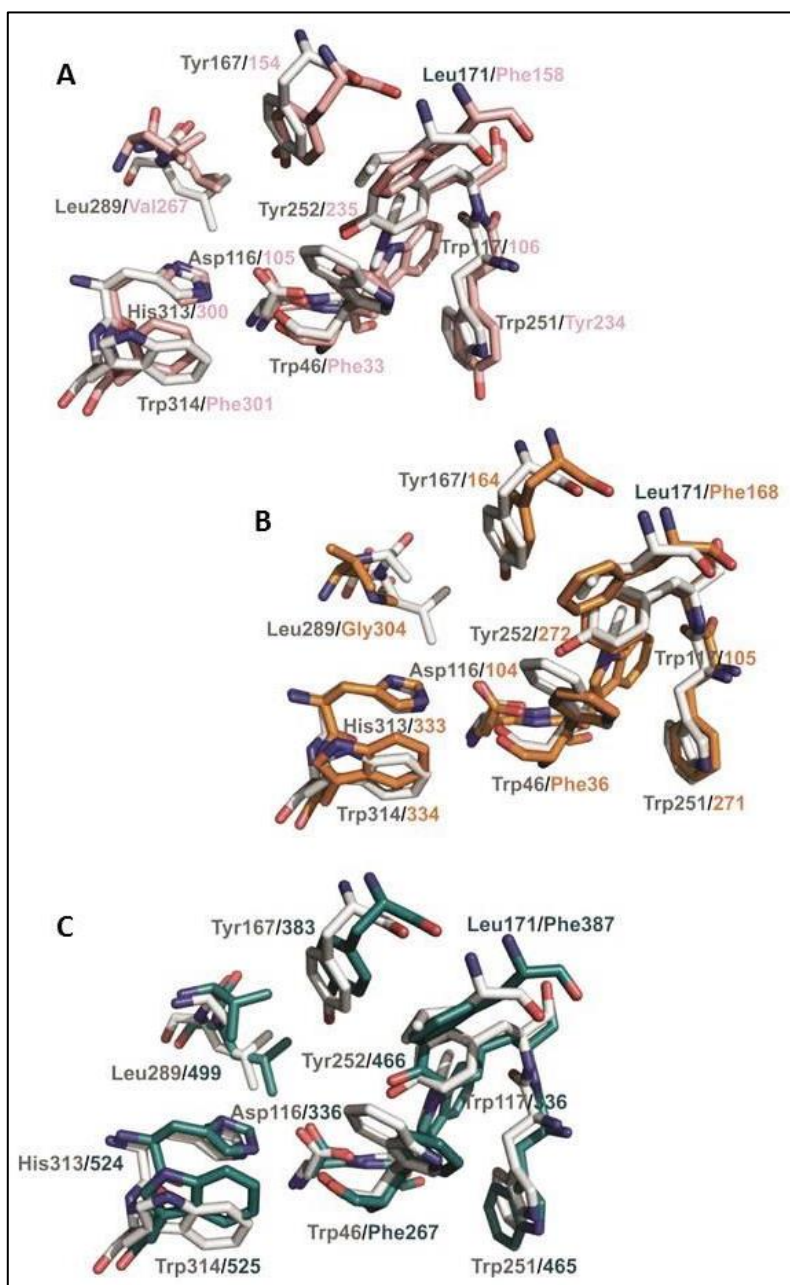


Figura 31– Sobreposição de resíduos do sítio ativo de diferentes EHs. Os resíduos da TrEH estão representados em branco. **A)** Sobreposição entre TrEH e EH de batata (rosa). **B)** Sobreposição entre TrEH e EH de *M. tuberculosis* (laranja). **C)** Sobreposição entre TrEH e EH humana (ciano).

Em relação aos resíduos conservados do sítio ativo, pode-se inferir que a TrEH possivelmente apresenta um mecanismo catalítico similar às outras sEH e que envolve um mecanismo S_N2 com duas etapas de reação para abertura e hidrólise do

grupo epóxido aos produtos dióis correspondentes. O Asp116 deve estar envolvido na primeira etapa da reação atacando o carbono do substrato epóxido para formar um intermediário covalente alquilenzima que é hidrolisado na etapa subsequente, que envolve a água ativada pela His313 (auxiliada pelo Asp286). Os resíduos Tyr162 e Tyr262 agem durante a protonação e o estado de transição para a formação do éster intermediário.

De acordo com a literatura, a sEH de *Solanum tuberosum* apresenta preferência por substratos enantioméricos de configuração (S)-(-) (Monterde *et al.*, 2004). Como a TrEH apresentou grande similaridade na sobreposição de resíduos do sítio ativo da sEH de batata (Figura 31A), corrobora com os dados obtidos por Oliveira, *et al.* 2015 sobre a enantiopreferência aos substratos de configuração (S)-(-). Entretanto, não somente a diferença entre os resíduos que está envolvida na enantiosseletividade das enzimas. O modo de ligação ao substrato e pequenas alterações conformacionais também desempenham um importante papel durante a catálise. Entretanto, a arquitetura do sítio ativo, incluindo os resíduos do domínio cap que não são conservados e a flexibilidade estrutural dessas proteínas pode influenciar na enantiosseletividade, sendo difícil concluir a respeito da enantiopreferência de uma enzima sem a análise do complexo com ligantes ou análogos de substrato e um extenso estudo sobre a atividade de mutantes.

i) Comparações entre as sEH

O programa POCASA 1.1 (Yu *et al.*, 2010) foi utilizado para calcular o volume da cavidade catalítica das epóxido hidrolases. A Figura 35 apresenta as enzimas dispostas em ordem decrescente de volume dos bolsões. A sEH humana apresenta o maior volume de cavidade, $3175\text{\AA}^3$ (Figura 32A), seguida pela epóxido hidrolase de *Solanum tuberosum* com $3125\text{\AA}^3$ (Figura 32B). A TrEH e a B1EPH2 apresentam respectivamente, 2317 e $2007\text{\AA}^3$ (Figuras 32C e 32D). A estrutura com menor cavidade é a sEH de *Mycobacterium tuberculosis*, com $817\text{\AA}^3$ (Figura 32E).

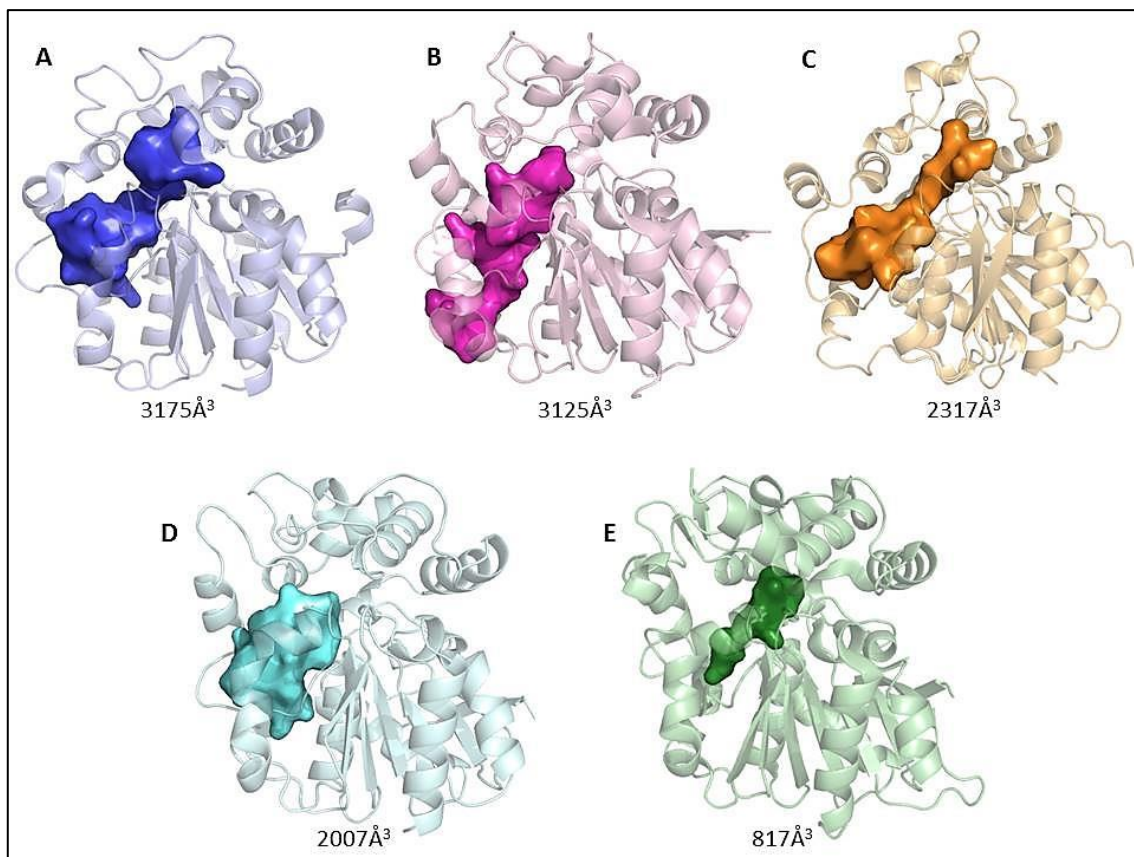


Figura 32– Cavidades catalíticas das sEH. **A)** EH humana. **B)** EH de batata. **C)** TrEH **D)** B1EPH2. **E)** EH de *M. tuberculosis*. As regiões de cores destacadas correspondem às regiões dos sítios ativos das enzimas.

De acordo com a Figura 32, pode-se inferir que a similaridade existente entre as enzimas quando se considera a semelhança na conformação estrutural e sequência de aminoácidos, nem sempre está relacionada à similaridade existente em relação ao tamanho da cavidade catalítica que delimita o sítio ativo, consequentemente, duas estruturas semelhantes podem apresentar afinidades diferentes para diferentes tipos de substratos. Por exemplo, a B1EPH2 apresentou 49% de similaridade com a EH de *Mycobacterium tuberculosis*, porém o sítio catalítico da EH de *Streptomyces wadayamensis* é mais semelhante ao sítio catalítico da TrEH, na qual ambas as enzimas apresentam apenas 28% de similaridade. De acordo com o tamanho das cavidades catalíticas da B1EPH2, TrEH, EH de *Homo sapiens* e de batata, pode-se supor que essas enzimas apresentam afinidade por uma gama maior de substratos epóxidos, principalmente de cadeias longas; já em relação à cavidade catalítica da EH de *M. tuberculosis*, pode-se inferir que essa enzima aceita uma gama muito limitada de substratos epóxidos. Importante ressaltar que volume das cavidades foi calculado a partir de estruturas sem substratos, análogos de substrato, inibidores ou cofatores, pois os volumes são alterados caso exista algum composto ligado ao sítio ativo das enzimas. Como exemplo, a EH de *M. tuberculosis*, na forma de apoenzima (PDB 23EJ) apresentou volume de cavidade de $817\text{\AA}^3$, porém, quando ligada ao inibidor difenilcarbamida (PDB 2ZJF) (Biswal *et al.*, 2008), o volume diminuiu para $472\text{\AA}^3$.

O alinhamento das sequências das epóxido hidrolases clássicas B1EPH2 e TrEH, juntamente com as sEH humana (3ANS), de batata (4UHB) e de *Mycobacterium tuberculosis* (2E3J) foi realizado com o auxílio do servidor ESPript 3.0 (Robert e Gouet, 2014). Na Figura 33, destacado em retângulos vermelhos, estão os resíduos altamente

conservados em todas as sequências; já os resíduos grafados em vermelho, são substancialmente conservados na maioria das sequências. Apesar das estruturas apresentarem certa porcentagem de similaridade estrutural, elas são bem divergentes na composição de resíduos de aminoácidos, sendo que as regiões altamente conservadas correspondem ao sítio ativo das enzimas.

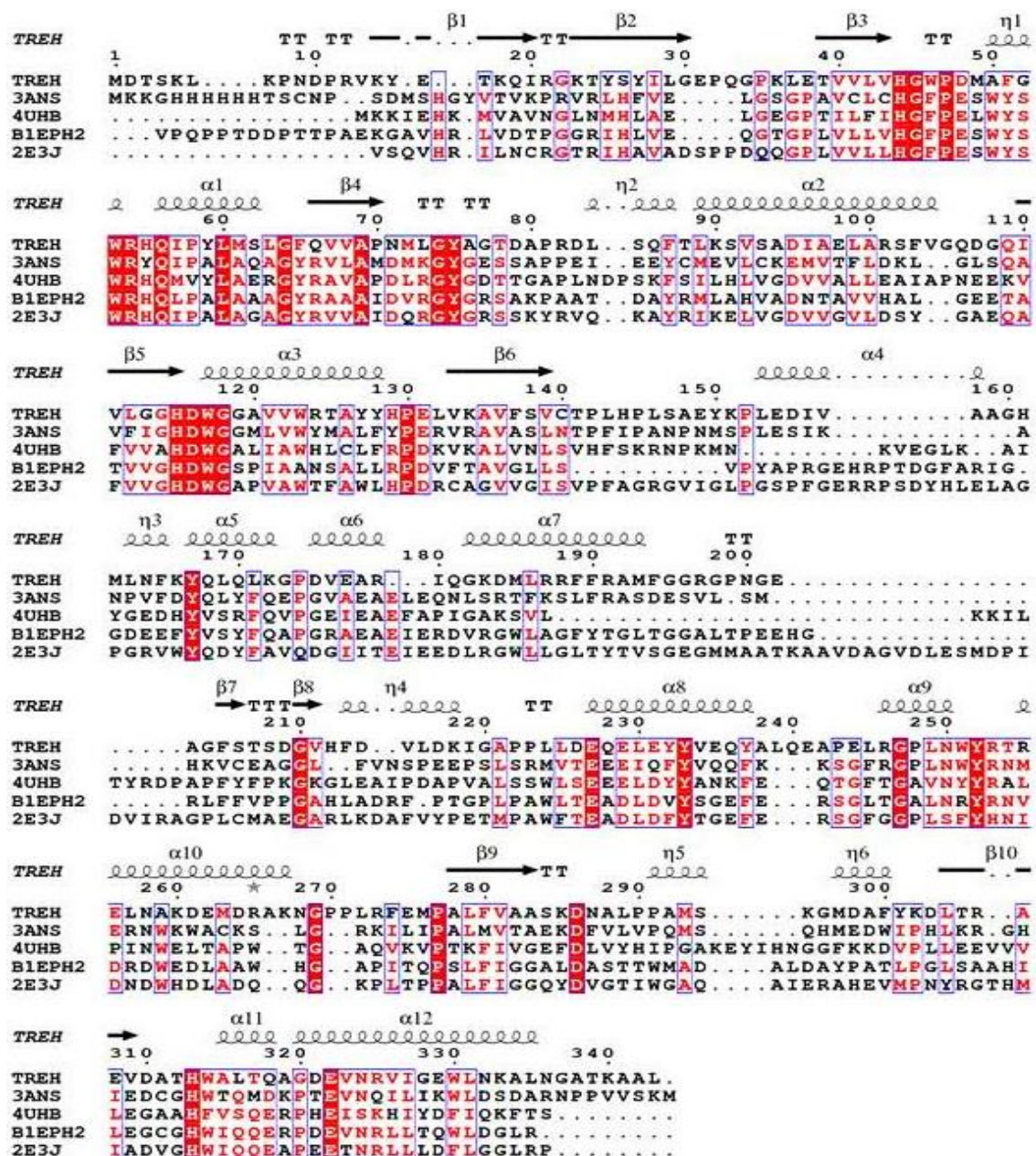


Figura 33– Alinhamento das sequências de epóxido hidrolases clássicas. 3ANS= EH humana; 4UHB= EH de batata; 2E3J= EH de *Mycobacterium tuberculosis*.

ii) B1EPH2 e TrEH

Com o intuito de realizar uma comparação entre as α/β -hidrolases caracterizadas no presente estudo, inicialmente foi feito o alinhamento das sequências de aminoácidos de ambas as enzimas, indicando uma similaridade de 28%. Com o auxílio do programa Pymol, a sobreposição entre as estruturas apresentou valor de rmsd igual à 1.751Å, indicando baixa similaridade entre a B1EPH2 e a TrEH quando comparada com as demais estruturas sobrepostas anteriormente, como a B1EPH2 sobreposta à EH *Mycobacterium tuberculosis*, com rmsd igual a 0.686Å. Em relação aos loops presentes no domínio cap e próximos ao sítio ativo, o loop da B1EPH2 abrange os resíduos 194-247 e a TrEH os resíduos 194-213, entretanto, o loop da TrEH, apresentou conformação aberta, já o lid da B1EPH2 apresentou a conformação fechada (Figura 34).

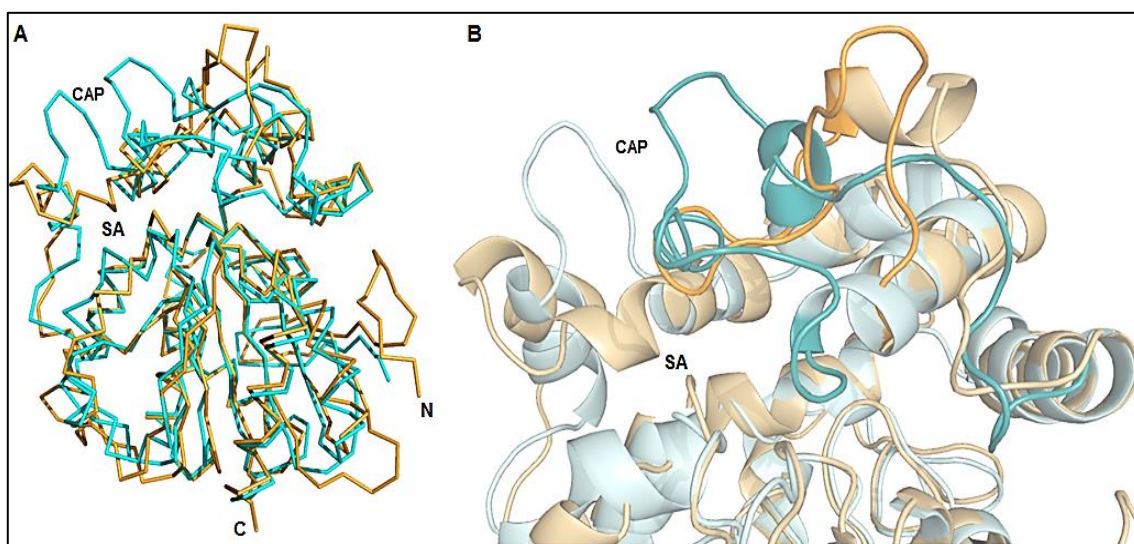


Figura 34– Sobreposição das estruturas da B1EPH2 e TrEH. **A)**Estrutura geral. **B)** Lid Hipotético da B1EPH2 (ciano) e daTrEH (laranja).

A sobreposição dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo de ambas as estruturas indicou que a grande maioria deles são conservados nessas estruturas, sendo que os aminoácidos conservados possuem algumas alterações conformacionais que

podem estar relacionadas ao modo de seleção de substratos dessas enzimas. Apenas dois resíduos do sítio ativo não são conservados. De acordo com a Figura 35, pode-se observar que os resíduos não conservados são o Phe36 e Glu38 na B1EPH2 e os resíduos Trp46 e Asp48 na TrEH. Os resíduos Phe36/Trp46 apresentam a função orientar a posição dos resíduos de His313/333 e da Tyr252/272 durante a catálise enzimática, sendo que algumas sEH apresentam o triptofano com essa atividade, porém o resíduo de fenilalanina é altamente conservado nessa classe enzimática. O resíduo Glu38 também contribui para a orientação da His333 ao interagir com uma molécula de água. Já o resíduo Asp48 da TrEH não interfere na orientação da His313 por apresentar um ângulo diferente.

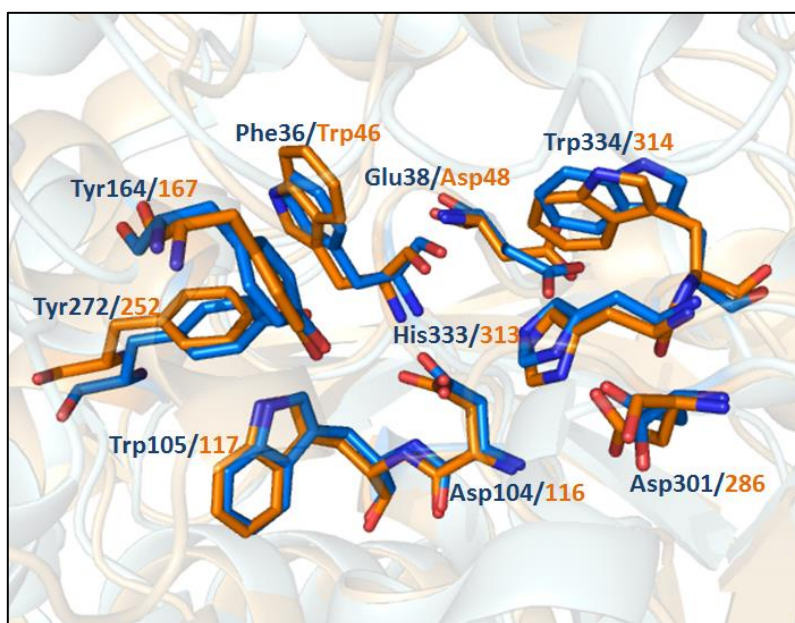


Figura 35– Sobreposição dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da B1EPH2 e TrEH. Os resíduos da B1EPH2 estão em azul e da TrEH em laranja.

Um dos aspectos entre a TrEH e B1EPH2, é que ambas apresentaram diversas divergências, como a baixa similaridade entre as sequências de aminoácidos (28%), baixo valor de alinhamento estrutural (rmsd igual à 1.751Å), diferenças significativas

quanto ao posicionamento dos loops que margeiam o sítio ativo (lid aberto e fechado), diferenças de cargas nas superfícies eletrostática do sítio ativo e alguns resíduos não conservados no sítio ativo. Entretanto, a característica que mais aproximou as duas enzimas refere-se ao volume da cavidade que constitui o sítio ativo, indicando que, apesar da possibilidade da existência de enantiopreferências divergentes entre essas enzimas, elas aceitam moléculas de substratos com comprimentos de cadeia semelhantes.

3) Mutante Lsd19 E197D

a) Purificação

Após a expressão, a Lsd19 E197D foi submetida à cromatografia de afinidade que está representada pelo cromatograma da Figura 36A. De acordo com a figura, pode-se observar que o perfil cromatográfico apresentou um único pico, EL, eluído a partir do volume de 120 mL (24 volumes de coluna) na concentração de aproximadamente 15% do tampão de eluição à 500 mM. A Figura 36B apresenta o SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue proveniente das frações obtidas nessa etapa de purificação. No gel, a proteína aparece pura e sem bandas contaminantes e com massa molecular de aproximadamente 30 kDa.

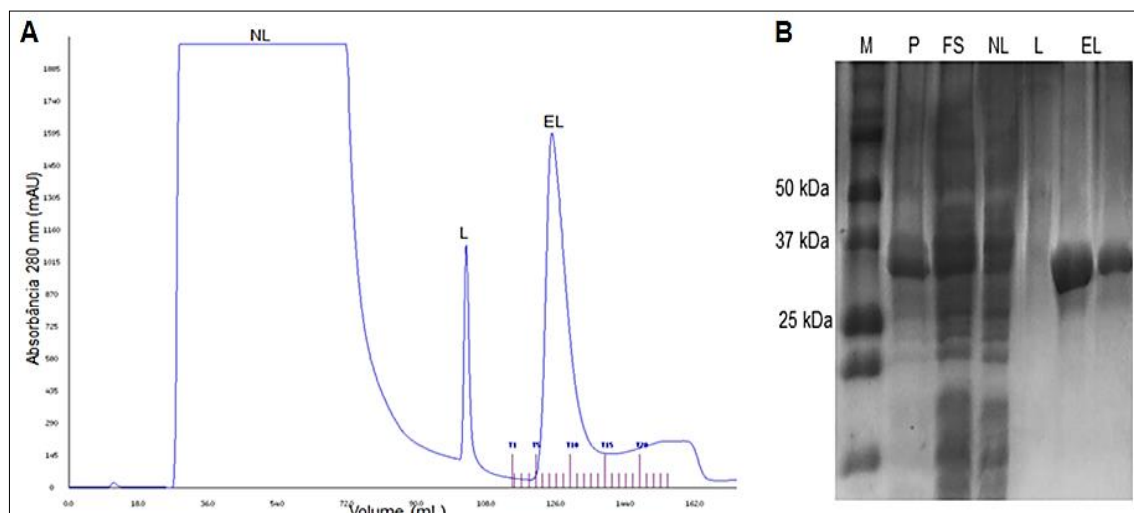


Figura 36– Cromatografia de Afinidade da Lsd19 E197D. **A)** Cromatograma resultante. NL= Não-Ligado; L= Lavagem do não-ligado; EL= Pico resultante do processo de eluição.**B)** SDS-PAGE das frações obtidas na cromatografia. M= Marcador (kDa); P= Pellet; FS= Fração Solúvel; NL= Não-Ligado; L= Lavagem do não-ligado; EL= Pico resultante do processo de eluição.

Após o processo de purificação por afinidade, a Lsd19 E197D foi concentrada e submetida à purificação por gel filtração. Apesar da proteína ter aparecido pura após a cromatografia de afinidade (Figura 36B), esta etapa subsequente de purificação foi realizada para eliminar os contaminantes presentes em menor concentração e, principalmente para retirar o imidazol, minimizando o risco de precipitação da proteína. Na gel filtração, a eluição se deu em dois picos distintos, EL1 e EL2 (Figura 37). O pico EL1 eluiu no volume de retenção de 40 mL e o EL2 no volume de 60 mL.

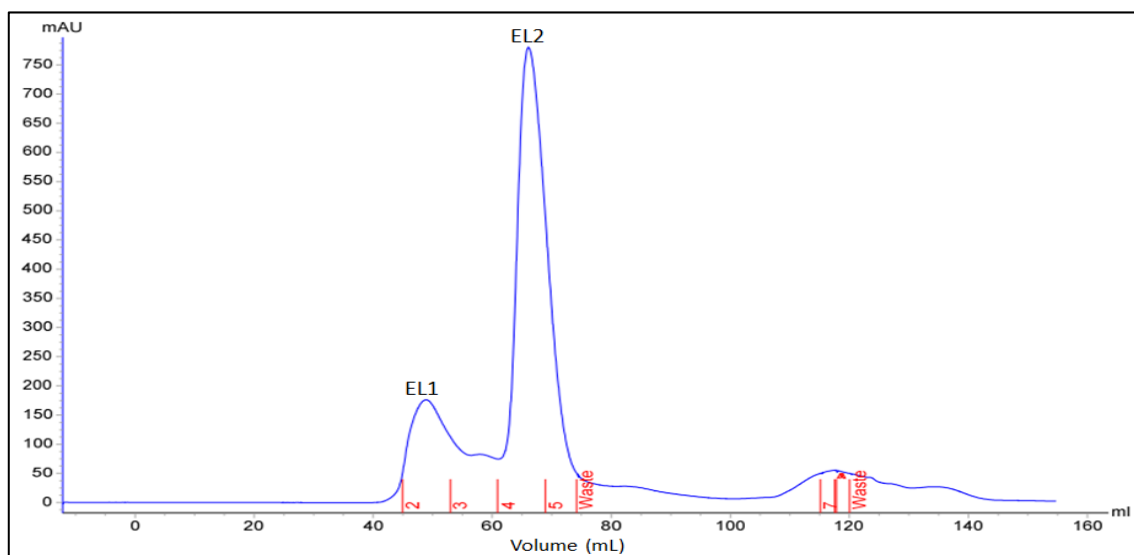


Figura 37– Cromatografia de Gel Filtração da Lsd19 E197D. EL1 e EL2= Picos resultantes do processo de eluição.

b) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X

A intenção de obtenção da estrutura da enzima mutante Lsd19 E197D faz parte de um estudo maior que tem como objetivo obter informações estruturais sobre diversos mutantes funcionais para esta enzima que apresentaram a manutenção, diminuição ou abolição da produção de lasalocida em *S. lasaliensis*. O grupo de pesquisa do Professor Peter Leadlay (Universidade de Cambridge) realizou a construção de 16 mutantes funcionais e analisou o efeito de tais mutações *in vitro* em culturas de *S. lasaliensis* (Tabela 6). Embora diversas tentativas de se obter as estruturas cristalográficas para tais mutantes tenham sido efetuadas, obtivemos apenas a estrutura para o mutante Lsd19 E197D, que será discutido nesse trabalho.

Tabela 6– Diferentes mutações da Lsd19 e os efeitos na produção da lasalocida *in vivo*.

Mutações LasB	Diminui/Inibe	Sem Efeito
LasB_C	*	
LasB_N	*	
Y14F		*
D38E	*	
L51A		*
E65A	*	
E65D		*
H146A	*	
D170E	*	
V195A		*
E197A	*	
E197D	*	
D38E/E65D	*	
D170/E197D	*	
D38E/D170E	*	
E65D/E197D	*	

As condições de cristalização do mutante Lsd19 E197D estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7– Condições de cristalização da Lsd19 E197D.

Lsd19 E197D	
Concentração Proteína	12,5 mg/mL
Kit	Crystal Screen
Condição Inicial (“hits”)	0,1 M Acetato de Sódio pH 4,6 2,0 M Formato de Sódio
Condição Refinamento	0,1 M Acetato de Sódio pH 4,6 1,6 M Formato de Sódio
Co-cristalização	Valpromida
Período Crescimento	5-7 dias
Temperatura	18°C

Após a realização do refinamento das condições de cristalização e obtenção dos cristais (Figura 38A), estes obtiveram o melhor valor de difração de raios-x de 1.67Å.e pertencem ao grupo espacial hexagonal P 6₃ 2 2. O padrão de difração é apresentado na Figura 38B. Foi utilizado o glicerol 10% como crioprotetor para evitar a formação de anéis de gelo.

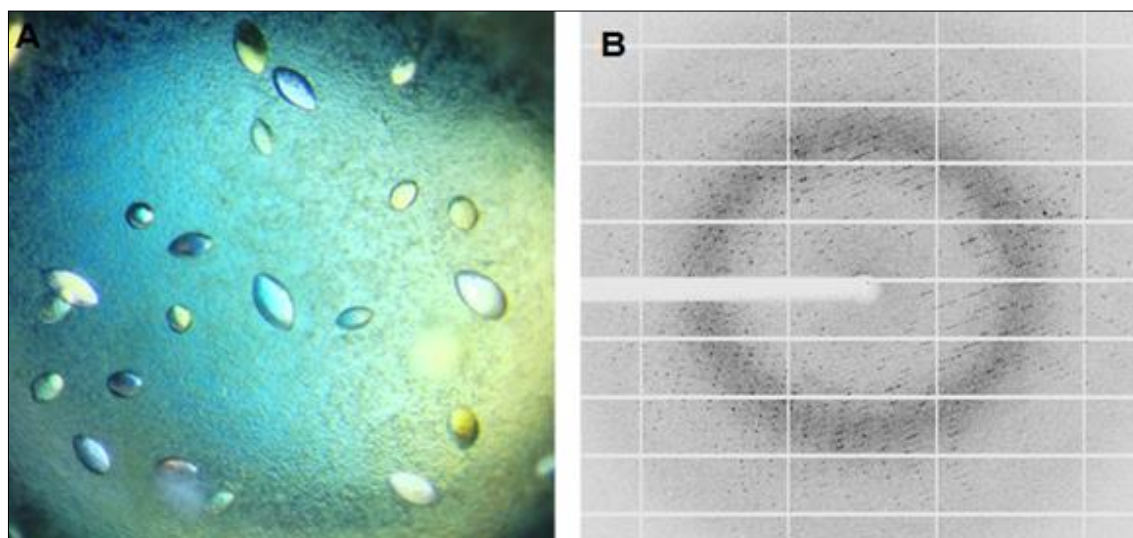


Figura 38– Cristalização e Difração de Raios-X da Lsd19 E197D. **A)** Cristais com valpromida visualizados em microscópio estereoscópico com aumento de 80X. **B)** Imagem de difração de raios-X.

A resolução da estrutura se deu a partir da substituição molecular utilizando como modelo a Lsd19 selvagem (PDB 3RGA) (Hotta *et al.*, 2012). O mutante apresentou um dímero na unidade assimétrica com 557 resíduos e 319 moléculas de água com R_{factor} e R_{free} finais de 18,4% e 20,9%, respectivamente. Os dados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8– Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da Lsd19 E197D.

Lsd19 E197D	
Fonte de Raios-X/ Comprimento de Onda (Å)	PETRA-III/ 0.975
Resolução (Å)	46.13 – 1.67 (1.73 – 1.67)
Grupo Espacial	P 63 2 2
Célula Unitária	92.252 92.252 139.009 90 90 120
Reflexões Totais	1559425 (161139)
Reflexões Únicas	41204 (4011)
Multiplicidade	37.8 (40.2)
Completeza (%)	99.99 (100.00)
I/sigma(I)	36.15 (2.49)
R-merge	0.06522 (1.78)
R-work (%)	0.1848
R-free (%)	0.2098
Resíduos	557
RMS Ligações/ Ângulos	0.026/ 1.620
Ramachandran Favorável/ Permitido/ Outliers (%)	99.00/ 1.00/ 0.00

c) Determinação Estrutural

Como esperado, de acordo com a análise estrutural, a Lsd19 E197D mostrou um enovelamento similar da Lsd19 selvagem, indicando que a mutação E197D não tem efeito sobre a estrutura terciária da enzima. A enzima Lsd19 apresenta dois domínios, o Domínio A ou N-terminal e Domínio B ou C-terminal, sendo ambos formados por três α -hélices e uma β -folha composta de seis fitas, arranjadas de forma semelhante a um cone (Figura 39). Os domínios apresentam apenas duas regiões distintas entre si. O domínio Lsd19A possui um extra-loop de sete resíduos (89-96) localizado entre β 4 e β 5, estando posicionado logo na entrada do sítio ativo desse domínio, o que indica que esse loop pode estar diretamente relacionado à ligação dos substratos, podendo apresentar configuração diferente na presença ou ausência de ligantes. O domínio Lsd19B apresenta uma α -hélice extra na entrada do sítio ativo com oito resíduos (224-231) posicionada entre β 3 e β 4.

Foram realizados diversos experimentos visando a obtenção da estrutura da Lsd19 E197D em complexo com o inibidor de EH valpromida e o substrato lasalocida. Entretanto, a análise do sítio ativo da enzima não revelou a presença de densidade eletrônica correspondente a esses compostos.

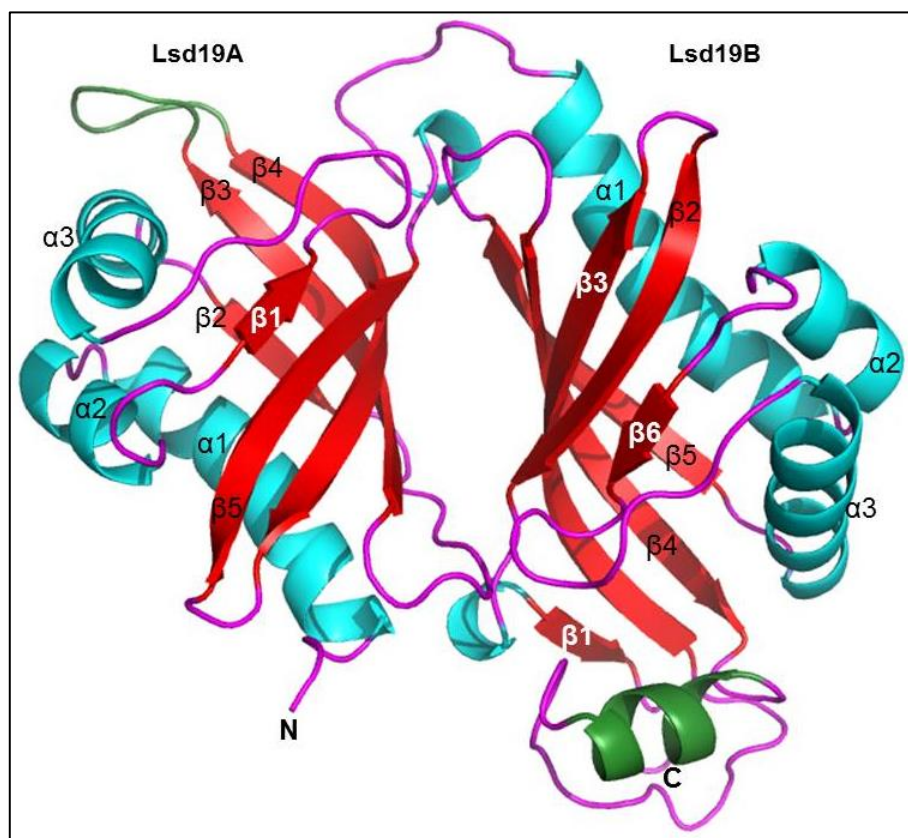


Figura 39– Estrutura cristalográfica da Lsd19 E197D. As α -hélices estão em ciano, as β -folhas em vermelho e os loops em magenta. Os extras loop-hélice-loop estão representados em verde.

A superfície eletrostática da E197D indica que a região mais profunda do sítio ativo de ambos os domínios é negativamente carregada de modo similar à superfície da enzima que é predominantemente negativa; já a entrada dos sítios ativos é carregada positivamente no mutante. A Lsd19 selvagem também apresenta a carga negativa na região mais profunda do sítio ativo e carga positiva na entrada da cavidade, entretanto, na superfície da estrutura geral da proteína selvagem, a carga é predominantemente positiva. A Figura 40A apresenta a superfície eletrostática geral do mutante, em que as cores vermelho, branco e azul representam as cargas negativa, neutra e positiva, respectivamente. A Figura 40B apresenta a superfície em corte vista sob ângulos opostos, onde destaca-se a cavidade do sítio ativo.

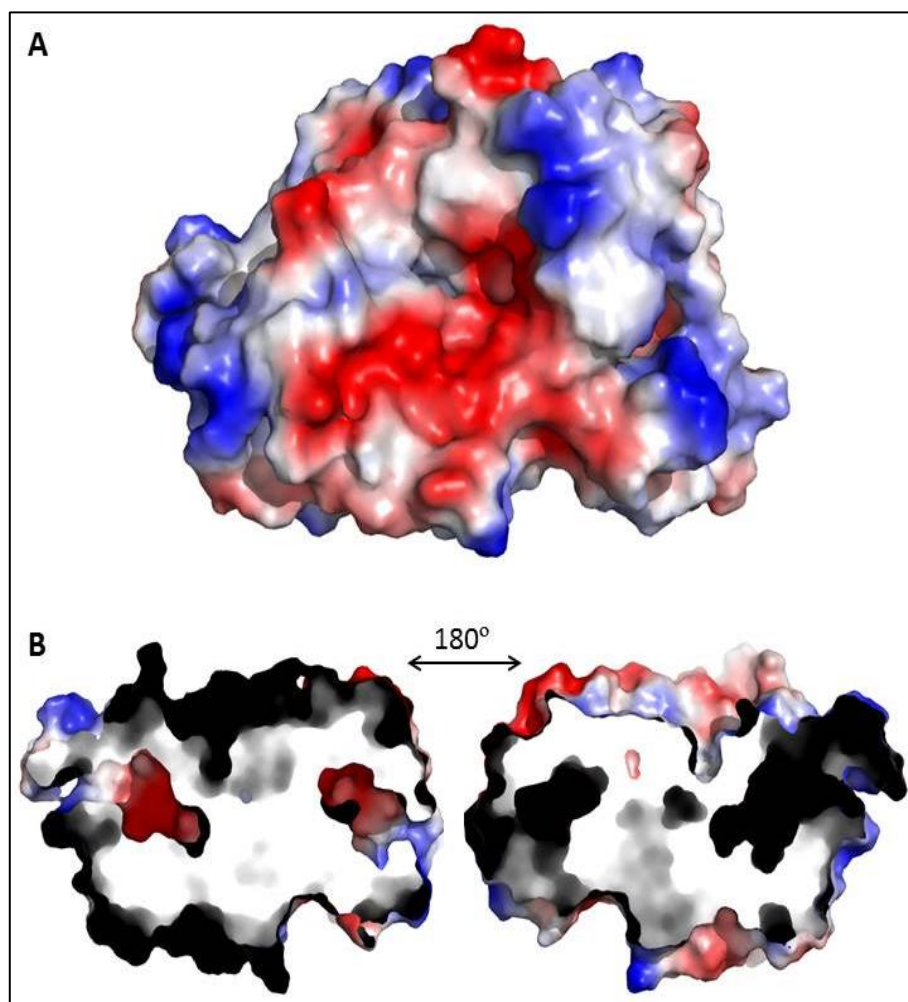


Figura 40– Superfície eletrostática da Lsd19 E197D. **A)** Superfície geral mostrando as diferentes cargas. Azul= positiva; Branco= neutra; Vermelho= negativa. **B)** Superfície em corte para melhor visualização das cavidades catalíticas.

Para a obtenção de insights estruturais sobre o efeito de perda de atividade do mutante Lsd19 E197D, as estruturas das enzimas selvagem e mutante foram sobrepostas utilizando-se o programa Pymol, resultando em um valor de rmsd igual a 0.311Å. A Figura 41 mostra a sobreposição dos resíduos que compõem o sítio ativo da Lsd19 selvagem (PDB 4RZM) (Hotta *et al.*, 2012) com o mutante Lasd19 E197D. De acordo com a disposição dos resíduos do sítio ativo pode-se observar que a mutação E197D não causou nenhuma influência nos outros resíduos catalíticos. Entretanto, como o

ácido aspártico (Figura 41) possui uma cadeia lateral de menor comprimento, isso provocou um aumento na distância entre o resíduo e o substrato, interferindo na ciclização do epóxido, que dessa maneira, não está em uma posição favorável para o ataque nucleofílico em um dos carbonos do grupo epóxido que iniciará a cascata de reações que culminará com o fechamento dos anéis éteres da lasalocida.

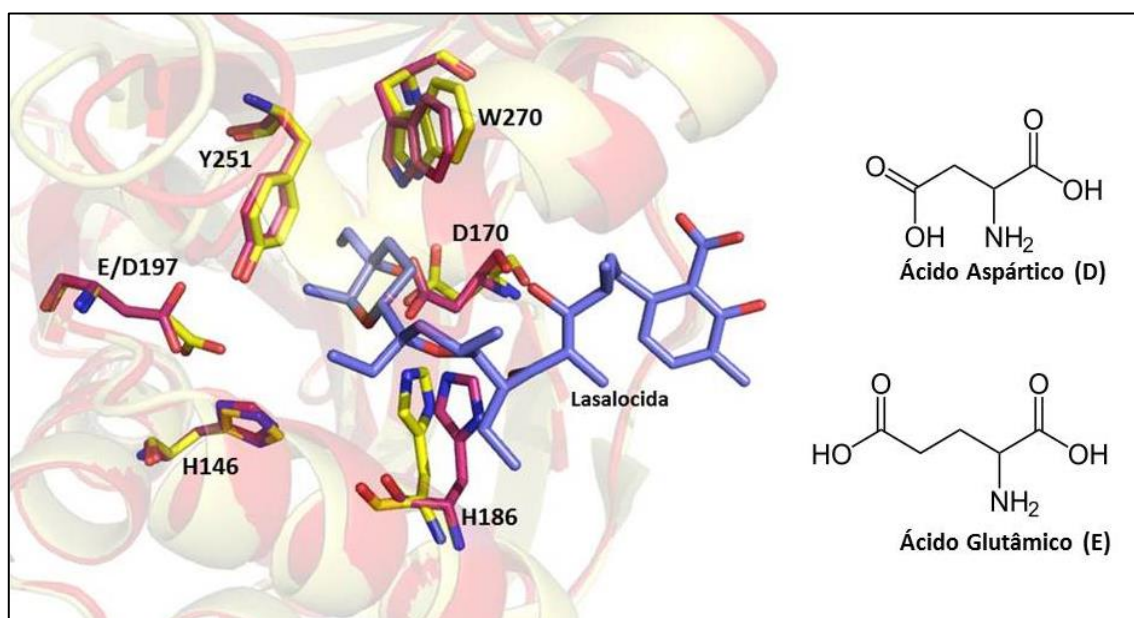


Figura 41– Sobreposição dos resíduos do sítio ativo da Lsd19 selvagem e do mutante E197D. Os resíduos da Lsd19 estão em amarelo e do mutante estão representados em rosa. O substrato ciclizado lasalocida A da enzima selvagem está representado em azul.

4) Epóxido Hidrolase TsnB

a) Purificação

A afinidade da TsnB está representada na Figura 42A, onde pode-se observar que a mesma apresentou dois picos distintos, EL1 e EL2, eluídos em aproximadamente 15 e 30% da concentração do tampão de eluição à 500 mM. O processo de lavagem do

não-ligado não é mostrada no cromatograma pois foi realizada com auxílio de bomba peristáltica. A Figura 42B apresenta o SDS-PAGE corado com Coomassie Blue proveniente das frações obtidas na purificação, sendo que a proteína está pura em EL1 e EL2 e com massa molecular de 17 kDa.

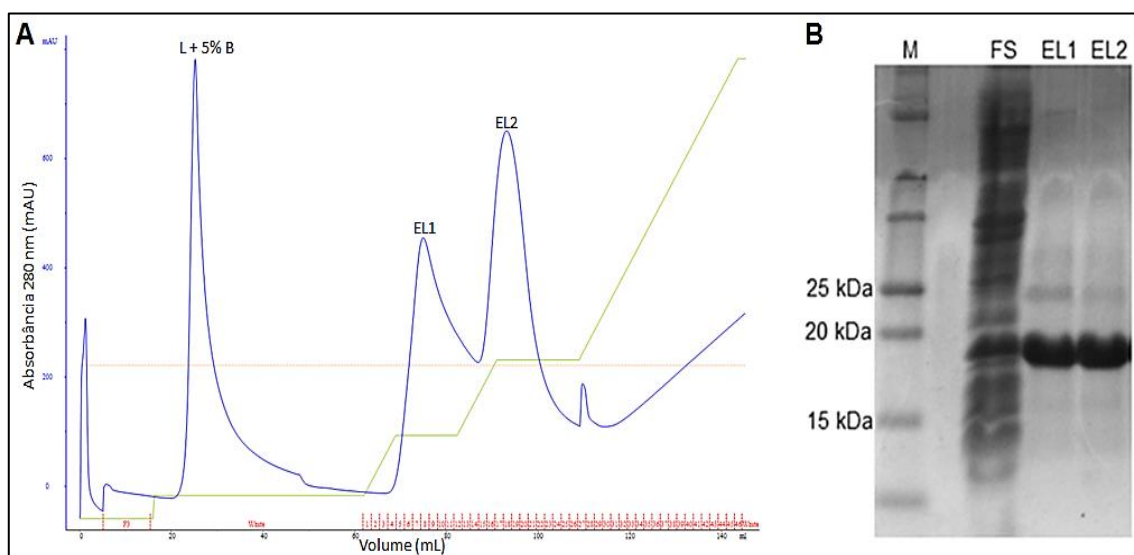


Figura 42– Cromatografia de Afinidade da TsnB. **A)** Cromatograma resultante. L= Lavagem do não-ligado; EL1 e EL2= Picos resultantes do processo de eluição. **B)** SDS-PAGE das frações obtidas na cromatografia. M= Marcador (kDa); FS= Fração Solúvel; EL= Pico resultante do processo de eluição.

Após a cromatografia de afinidade, foi feito um pool com os picos EL1 e EL2 resultantes da eluição, que foram concentrados e submetidos à purificação por gel filtração para eliminar os contaminantes presentes em menor concentração e, principalmente para retirar o imidazol. Na gel filtração, a eluição se deu em um único pico (EL) a partir de 85 mL do volume de retenção da coluna (Figura 43).

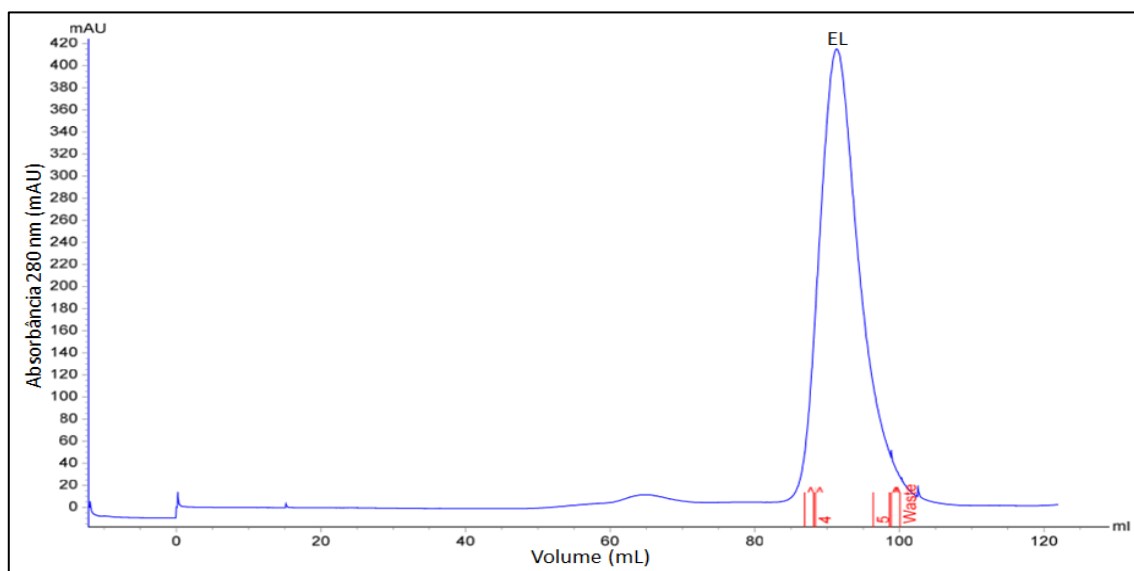


Figura 43– Cromatografia de Gel Filtração da TsnB. EL= Pico resultante do processo de eluição.

b) Ensaios de Cristalização e Difração de Raios-X

As condições de cristalização da TsnB estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9– Condições de cristalização da TsnB.

TsnB	
Concentração Proteína	12,5 mg/mL
Kit	JCSG++
Condição Inicial (“hits”)	200 mM Sulfato de Lítio 200 mM Acetato de Sódio pH 4,5 50% PEG 400
Condição Refinamento	200 mM Sulfato de Lítio 200 mM Acetato de Sódio pH 4,7 50% PEG 400
Co-cristalização	<i>trans</i> -2,3-epoxibutano e <i>cis</i> -2,3-epoxibutano
Período Crescimento	3-4 dias
Temperatura	18°C

Os cristais obtidos (Figura 44A) pertencem ao grupo espacial cúbico I 2 3 e difrataram à 1.85Å. O padrão de difração de raios-X está apresentado na Figura 44B. Não foram adicionados crioprotetores pois o PEG 400 presente na solução de cristalização possui função crioprotetora.

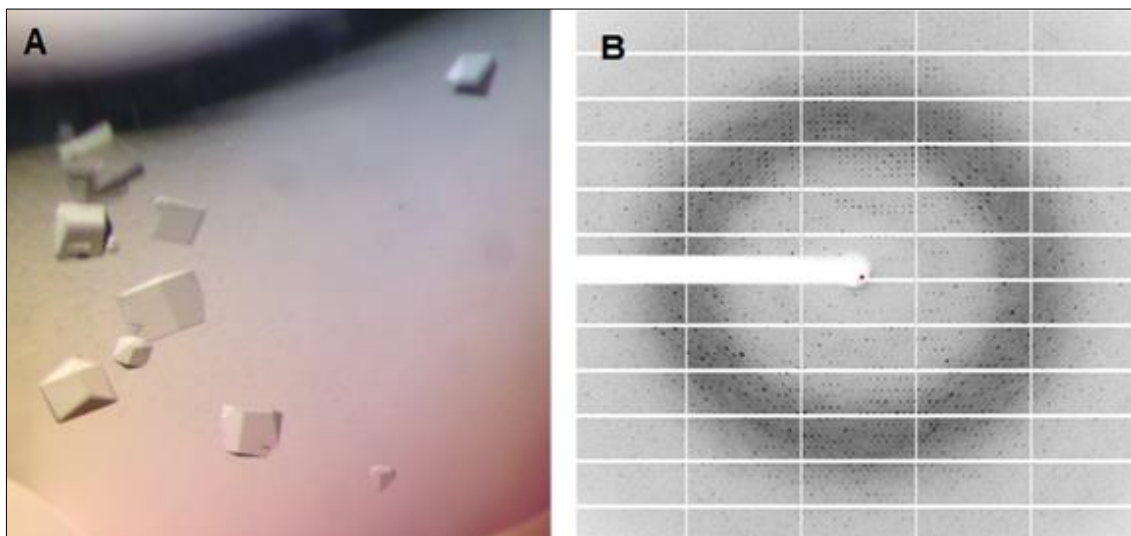


Figura 44– Cristalização e Difração de Raios-X daTsnB. **A)** Cristais com *trans*-2,3-epoxibutano visualizados em microscópio estereoscópico com aumento de 80X. **B)** Imagem de difração de raios-X.

A estrutura da TsnB foi resolvida a partir da substituição molecular utilizando como modelo a epóxido hidrolase TmnB de *Streptomyces sp* NRRL 11266 (dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa ainda não publicados), sendo que ambas as estruturas apresentam uma similaridade de 70%. A estrutura final apresentou um dímero na unidade assimétrica com 261 resíduos e 62 moléculas de água com R_{factor} e R_{free} finais de 21,7% e 25,0%, respectivamente. Os dados de difração e as estatísticas cristalográficas da TsnB encontram-se sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10– Estatísticas dos dados de cristalografia e refinamento da TsnB.

TsnB	
Fonte de Raios-X/ Comprimento de Onda (Å)	PETRA-III/ 0.975
Resolução (Å)	46.17 – 1.854 (1.921 – 1.854)
Grupo Espacial	I 2 3
Célula Unitária	130.602 130.602 130.602 90 90 90
Reflexões Totais	1239813 (122828)
Reflexões Únicas	31474 (3134)
Multiplicidade	39.4 (39.2)
Completeza (%)	99.98 (99.94)
I/sigma(I)	41.25 (1.79)
R-merge	0.05541 (1.7)
R-work (%)	0.2177
R-free (%)	0.2507
Resíduos	261
RMS Ligações/ Ângulos	0.007/ 1.03
Ramachandran Favorável/ Permitido/ Outliers (%)	98/ 1.61 / 0.39

c) Determinação Estrutural

A análise estrutural preliminar da TsnB mostrou o fold característico das Limoneno Epóxido Hidrolases apresentando dois protômeros idênticos entre si, em que cada um consiste em três α -hélices e uma β -folha composta de seis fitas arranjadas de forma semelhante a um cone. O sítio ativo encontra-se localizado na cavidade interna formada pelo arranjo das fitas da β -folha, semelhante à Lsd19. A Figura 45 apresenta a superfície de dimerização dos protômeros e os elementos que compõe cada um deles.

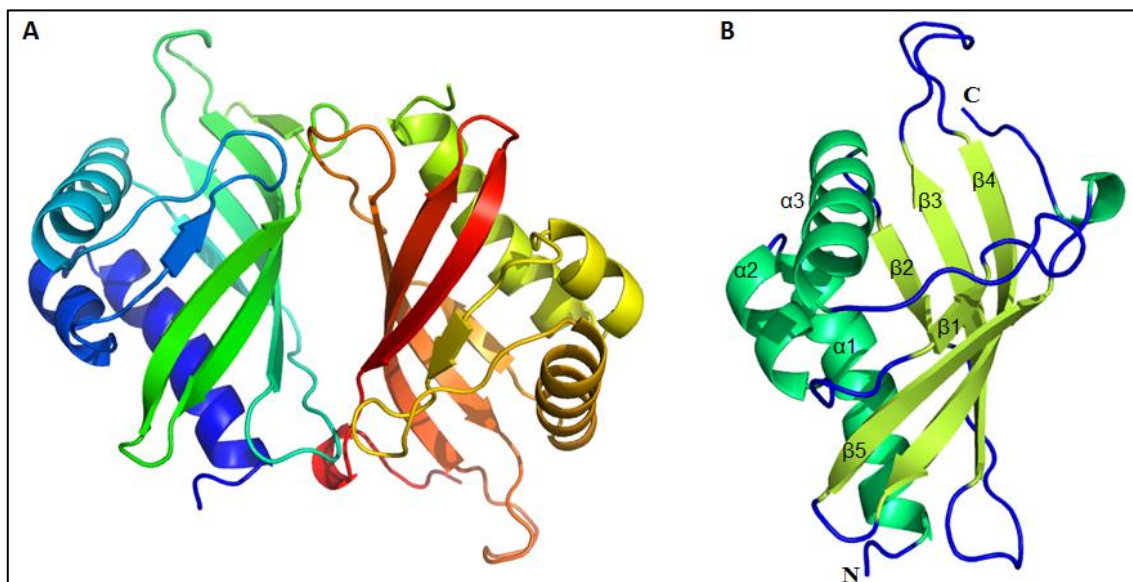


Figura 45— Estrutura Cristalográfica da TsnB. **A)** Disposição dos protômeros na formação do dímero. **B)** Estrutura do protômero. Os loops estão em azul, as α -hélices em verde e a β -folha em amarelo.

Em relação às análises estruturais da TsnB, optamos por focar em compará-la às diferentes características da estrutura da TmnB, visto que ambas as enzimas tiveram suas estruturas resolvidas pelo nosso grupo de pesquisa, além de apresentarem elevada semelhança na sequência de aminoácidos (70%). Quanto às superfícies eletrostáticas das enzimas, a Figura 46 apresenta as diferentes cargas nos protômeros e nas cavidades do sítio ativo. As cores vermelho, branco e azul representam as cargas negativa, neutra e positiva, respectivamente. A superfície eletrostática geral da TsnB (Figura 46A) apresenta uma distribuição de cargas negativa e positiva e a cavidade que abriga o sítio ativo apresenta cargas negativas, tanto na região mais profunda do sítio quanto na entrada do sulco. Já a superfície da TmnB (Figura 46B) apresenta predominantemente cargas positivas e neutras; quanto ao sítio ativo, a região mais profunda apresenta carga negativa e a entrada do bolsão é positivamente carregada, sendo semelhante às cargas do sítio ativo da Lsd19.

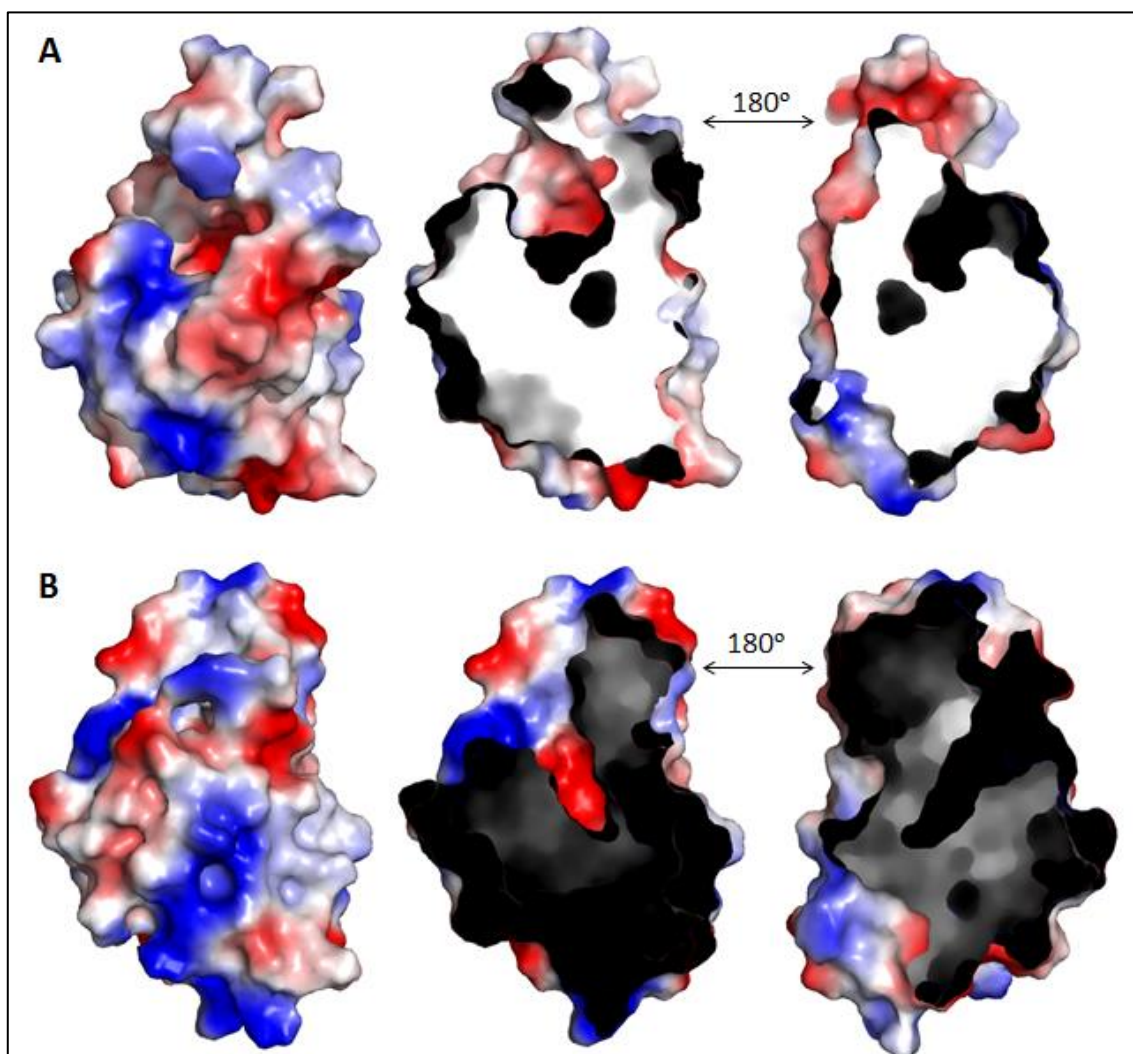


Figura 46– Superfície eletrostática da TsnB e TmnB. **A)** Superfície geral e corte da cavidade catalítica da TsnB; **B)** Superfície geral e corte da cavidade catalítica da TmnB. Azul= positiva; Branco= neutra; Vermelho= negativa.

Na análise dos resíduos que compõem o sítio ativo da TsnB, observou-se que a enzima apresenta os resíduos essenciais para o mecanismo catalítico ácido-básico das LEH, assim como observado para a Lsd19 selvagem (Arand *et al.*, 2003; Hotta *et al.*, 2012). A Figura 47A apresenta o sítio ativo da TsnB. Em uma das extremidades do sítio ativo existe o Asp38 e a His54 que provavelmente são responsáveis pelo ataque nucleofílico ao grupo epóxido e, no lado oposto, está o resíduo Glu65, que age ativando

o grupo epóxido. A Tyr14 e o Trp121, provavelmente estão relacionados ao reconhecimento da estereosseletividade do substrato. As tirosinas Tyr36 e Tyr14 formam interações de hidrogênio com entre si, como observado nas epóxido hidrolases clássicas (Argiriadi *et al.*, 2000), indicando que a proximidade desses resíduos podem sugerir a hipótese de que essa enzima apresente mecanismo de catálise semelhante às α/β -hidrolases (Rink *et al.*, 2000; Biswal *et al.*, 2008). No entanto, com base na configuração do sítio ativo e a formação do produto, não existe a possibilidade desse processo ocorrer nessa enzima, porém, as tirosinas podem estar envolvidas na manutenção da posição correta dos grupos epóxidos para o ataque nucleofílico pelo Asp38. Quanto aos resíduos catalíticos da TmnB, estes apresentam-se conservados em relação à LEH de *S. longisporoflavus*, porém apresentam algumas diferenças consideráveis. A Figura 47B apresenta os resíduos catalíticos da TmnB. Comparando-se os sítios ativos, apenas os resíduos Tyr36/51 e Trp121/Ser121 não são conservados, sendo que seja possível que eles estejam envolvidos no reconhecimento de diferentes substratos quirais. Os resíduos conservados apresentam as mesmas funções dos resíduos da TsnB.

Foram realizados diferentes experimentos visando a obtenção da estrutura da TsnB em complexo com o inibidor de EH valpromida e os substratos epóxido glicidil-butil-éter; *trans*-2,3-epoxibutano; *cis*-2,3-epoxibutano e 1,2-epoxioctano. Entretanto, a análise do sítio ativo da enzima não revelou a presença de densidade eletrônica correspondente a esses ligantes ou a qualquer outro composto orgânico utilizado na preparação e cristalização da enzima. Com isso, não podemos inferir a respeito da enantiosseletividade da TsnB devido à ausência de ligantes e substratos no sítio ativo da

enzima. Nosso grupo de pesquisa resolveu a estrutura da TmnB com a valpromida e, para obter algumas noções a respeito do mecanismo de catálise e observar possíveis mudanças conformacionais no sítio ativo, foi realizada a sobreposição da estrutura na forma de apoenzima juntamente à estrutura em complexo com o ligante, mostrando que a valpromida não provocou mudanças conformacionais significantes na posição dos resíduos do sítio ativo. A valpromida realizou interações de hidrogênio diretamente com o Asp38 e com os resíduos Tyr14 e Glu65 por meio de uma molécula de água (Figura 47B).

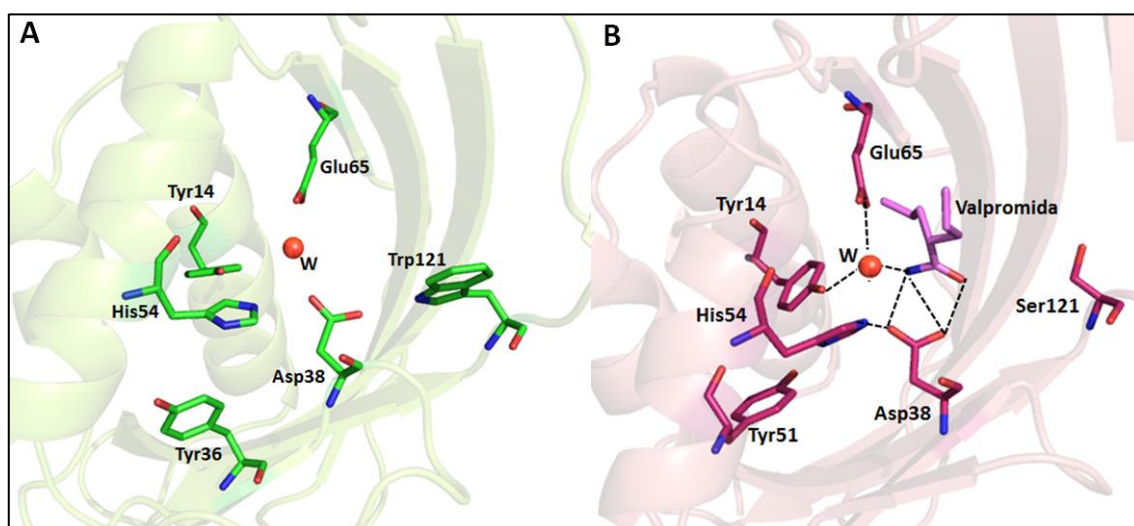


Figura 47– Resíduos do sítio ativo da TsnB e TmnB. **A)** Resíduos da TsnB em verde; **B)** Resíduos da TmnB em magenta. As esferas em vermelho representam moléculas de água.

Embora os resíduos essenciais para a catálise ácido-básica sejam conservados nas estruturas da TsnB e TmnB, os resíduos hidrofóbicos que formam a cavidade do sítio ativo possuem várias diferenças entre si e com configuração completamente distinta. Esta diferença provavelmente está relacionada às orientações *R*(+) e *S*(+) dos substratos destas enzimas. A substituição de vários resíduos na entrada do sítio ativo se assemelha com as configurações direita e esquerda na ancoragem do substrato, com

isso, os substratos poderiam entrar no sítio ativo de uma enzima pelo lado esquerdo e em outra pelo lado direito. Na TsnB, os resíduos responsáveis por essa seletividade são Tyr36, Leu51, Ala58, Ser61, Trp121 e Thr126 e na TmnB os resíduos Val36, Tyr51, Leu58, Tyr61, Ser121 e Met126. A Figura 48 apresenta a sobreposição dos resíduos hidrofóbicos na TsnB e TmnB.

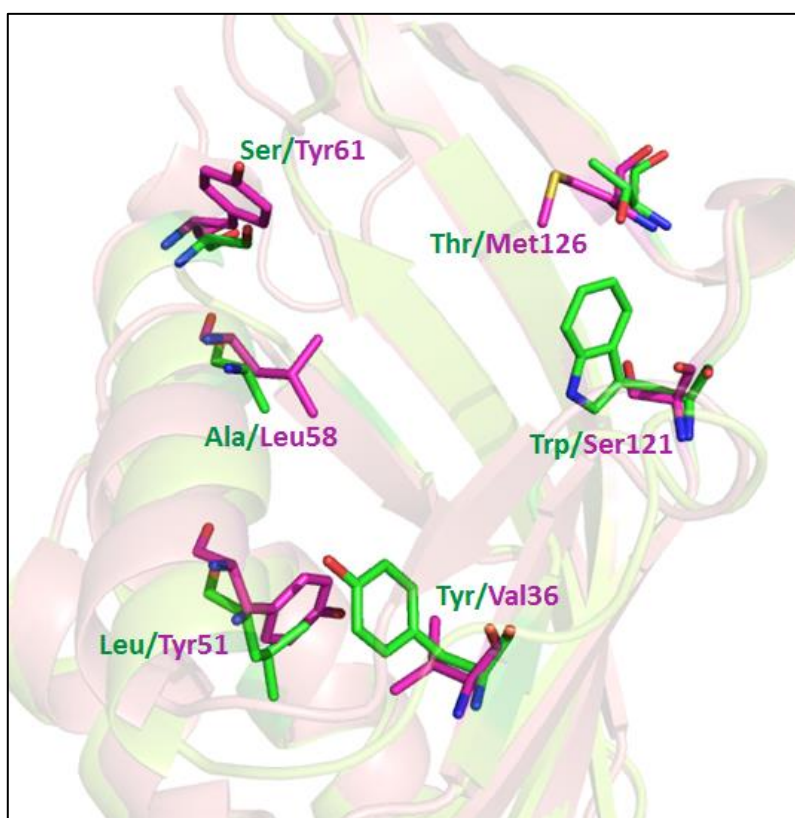


Figura 48– Sobreposição dos resíduos hidrofóbicos dos sítios ativos da TsnB e TmnB. Os resíduos da TsnB estão em verde e da TmnB em magenta.

O servidor POCASA foi utilizado para calcular o volume das cavidades catalíticas das enzimas, sendo que as cavidades apresentaram o volume de $454\text{\AA}^3$ e $433\text{\AA}^3$ para a TsnB e TmnB, respectivamente, mostrando uma diferença muito pequena nos volumes dos bolsões como esperado, pois apesar dos substratos serem estereoquimicamente diferentes, apresentam o mesmo tamanho (Figura 49).

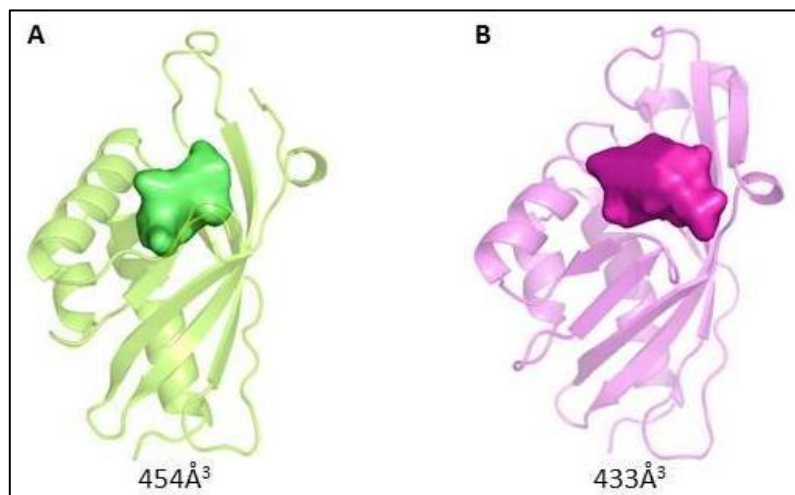


Figura 49– Cavidades catalíticas da TsnB e TmnB. **A)** TsnB (verde); **B)** TmnB (magenta).

V – CONCLUSÕES

Os objetivos gerais do projeto foram atingidos – purificação, cristalização, difração de raios-X e resolução das estruturas cristalográficas das epóxidos hidrolases B1EPH2 de *Streptomyces wadayamensis*, da TrEH de *Trichoderma reesei*, do mutante Lds19 E197D de *Streptomyces lasaliensis* e da TsnB de *Streptomyces longisporoflavus*.

A estrutura quaternária hexamérica obtida a partir da cristalização da B1EPH2 é a primeira sEH com essa conformação, não sendo encontradas na literatura outras sEH com esse arranjo estrutural. Além disso, essa é a primeira estrutura obtida de uma α/β -hidrolase clássica a partir de um organismo do gênero *Streptomyces sp*, sendo que as EHs de estreptomicetos conhecidas até o presente momento pertencem à classe das Limoneno Epóxido Hidrolases ou apresentam enovelamento atípico de α/β -hidrolase. Quanto ao sítio ativo, essa enzima apresentou os resíduos altamente conservados quando comparada às sEH humana, de *M. tuberculosis* e de *S. Tuberosum*, sendo esta última uma enzima com enantiopreferência por substratos de conformação (S)-(-). Porém, não podemos inferir com certeza a respeito na enantiosseletividade da B1EPH2, uma vez que precisamos dos dados dos testes enzimáticos para a obtenção de insights a respeito dos substratos utilizados pela enzima. Em breve, publicaremos os dados estruturais obtidos no presente estudo juntamente aos dados enzimáticos realizados pelos nossos colaboradores, assim esperamos obter algumas respostas a respeito da enantiopreferência da B1EPH2.

Obteve-se a primeira estrutura de uma epóxido hidrolase solúvel do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. Esta enzima tem um enovelamento semelhante às

epóxido hidrolase da classe α/β -hidrolases com estruturas previamente resolvidas. A TrEH mostrou ser uma enzima predominantemente monomérica com uma pequena fração de dímeros. Embora a TrEH tenha os resíduos essenciais conservados para a catálise, a cavidade do sítio catalítico revelou várias características novas comparadas a outras enzimas da mesma família. A arquitetura do sítio ativo TrEH tem substituições importantes em comparação com as sEHs humanas, de batata e *M. tuberculosis*, o que pode refletir na especificidade do substrato desta enzima, apesar de não podermos elucidar a base molecular de sua enatiopreferência para os substratos (S)-(-). No entanto, a determinação da estrutura TrEH abre novas vias para investigar o papel dos resíduos do sítio ativo através da mutagênese sítio dirigida. Além disso, a estrutura TrEH também contribuirá para o desenho de uma enzima mais estável e eficiente a ser utilizada na indústria de transformação durante o processo de degradação de xenobióticos ou na separação de compostos contendo misturas de epóxidos enantioméricos.

Obtivemos a estrutura do mutante E197D da Lsd19, uma LEH responsável pela síntese do antibiótico ionóforo lasalocida. Com base nos resíduos do sítio ativo da enzima mutada, observamos que a inibição da produção do antibiótico *in vivo* deve-se ao fato de que a substituição do resíduo Glu197 pelo Asp197 cessou a atividade da enzima devido à troca de um resíduo com cadeia longa por um com cadeia mais curta, aumentando a distância ao substrato epóxido.

Resolvemos a estrutura da TsnB e diversos aspectos interessantes puderam ser obtidos dessa enzima quando comparada à TmnB. Apesar de ambas as enzimas apresentarem semelhança de 70% na sequência de aminoácidos, o enovelamento e

resíduos catalíticos conservados, volumes das cavidades catalíticas semelhantes, ambas as enzimas apresentaram diferenças significativas quando às cargas das superfícies eletrostáticas de suas cavidades catalíticas e dos resíduos hidrofóbicos que margeiam a entrada do sítio ativo, o que é um forte indicador de que ambas as enzimas aceitam os mesmos substratos, porém com orientações quirais distintas.

VI – REFERÊNCIAS

AFONINE, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 68, n. Pt 4, p. 352-67, Apr 2012.

AMANO, Y.; YAMAGUCHI, T.; TANABE, E. Structural insights into binding of inhibitors to soluble epoxide hydrolase gained by fragment screening and X-ray crystallography. **Bioorg Med Chem**, v. 22, n. 8, p. 2427-34, Apr 2014.

ARAND, M. et al. Structure of *Rhodococcus erythropolis* limonene-1,2-epoxide hydrolase reveals a novel active site. **EMBO J**, v. 22, n. 11, p. 2583-92, Jun 2003.

ARAND, M.; WAGNER, H.; OESCH, F. Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4223-9, Feb 1996.

ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. Synthetic applications of epoxide hydrolases. **Curr Opin Chem Biol**, v. 5, n. 2, p. 112-9, Apr 2001.

ARCHELAS, A.; LACAZIO, G.; KOTIK, M. **Epoxide Hydrolases and their Application in Organic Synthesis**. Green Biocatalysis: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, US, 2016. 792p.

ARGIRIADI, M. A. et al. Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 20, p. 15265-70, May 2000.

ARGIRIADI, M. A. et al. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 19, p. 10637-42, Sep 1999.

ARGUMEDO-DELIRA, R. et al. Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. **J Environ Manage**, v. 95 Suppl, p. S291-9, Mar 2012.

BALDWIN, J. E. Rules for Ring Closure. **J Chem Soc, Chem Commun**, p. 734-736, 1976.

BARBIRATO, F. et al. The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases. **FEBS Lett**, v. 438, n. 3, p. 293-6, Nov 1998.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Aust J Exp Agric**, v. 48, p. 21-27, 2008.

BENEDETTI, F. et al. Impact of Stereochemistry on Ligand Binding: X-ray Crystallographic Analysis of an Epoxide-Based HIV Protease Inhibitor. **ACS Med Chem Lett**, v. 5, n. 9, p. 968-72, Sep 2014.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **J Anim Sci**, v. 58, n. 6, p. 1465-83, Jun 1984.

BERGER, J. et al. The Isolation of Three New Crystalline Antibiotics from *Streptomyces*. **J Am Chem Soc**, v. 11, p. 5295-5298, 1951.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 62, n. 3, p. 293-300, Sep 1951.

BISWAL, B. K. et al. The molecular structure of epoxide hydrolase B from *Mycobacterium tuberculosis* and its complex with a urea-based inhibitor. **J Mol Biol**, v. 381, n. 4, p. 897-912, Sep 2008.

BOTTALLA, A. L. et al. Epoxide Hydrolase-catalyzed kinetic resolution of a spiroepoxide, a key building block of various 11-heterosteroids. **Adv Synth Catal**, p. 1102-1110, 2007.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Quim Nova**, v. 32, p. 1288-1296, 2009.

CALLAWAY, T. R. et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Curr Issues Intest Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 43-51, Sep 2003.

CANE, D. E.; CELMER, W. D.; WESTLEY, J. W. Unified stereochemical model of polyether antibiotic structure and biogenesis. **J Am Chem Soc**, v. 11, p. 3594-3600, 1983.

CARUGO, O.; PONGOR, S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. **Protein Sci**, v. 10, n. 7, p. 1470-3, Jul 2001.

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **J Biochem Biophys Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 313-34, Oct 2001.

CHAN, Y. A. et al. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. **Nat Prod Rep**, v. 26, n. 1, p. 90-114, Jan 2009.

CHHABRA, N.; ASERI, M. L.; PADMANABHAN, D. A review of drug isomerism and its significance. **Int J Appl Basic Med Res**, v. 3, n. 1, p. 16-8, Jan 2013.

CLEIJ, M.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. Microbial Transformations. 43. Epoxide hydrolase as tools for the synthesis of enatiopure alpha-methylstyrene oxides: a new and efficient synthesis of (S)-Ibuprofen. **J Org Chem**, v. 64, n. 14, p. 5029-5035, 1999.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-44, Jun 1998.

CORAH, L. R. Polyether ionophores--effect on rumen function in feedlot cattle. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 7, n. 1, p. 127-32, Mar 1991.

CORTES, J. et al. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 176-8, Nov 1990.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quim Nova**, v. 22, p. 863-873, 1999.

DAVIES, A.; BROOME, A. W. Effects of the ionophore antibiotic ICI 139603 in lambs. **Proceed Nutr Soc**, v. 42, n. 91A, 1982.

DAVIES, A.; ROWE, J. B.; BROOME, A. W. ICI 139603: a novel ruminant growth promoter. **J Anim Sci**, v. 55, n. 415, 1982.

DE OLIVEIRA, G. S. et al. Data set of optimal parameters for colorimetric red assay of epoxide hydrolase activity. **Data Brief**, v. 8, p. 436-40, Sep 2016a.

DE OLIVEIRA, G. S. et al. Epoxide hydrolase of *Trichoderma reesei*: Biochemical properties and conformational characterization. **Int J Biol Macromol**, v. 89, p. 569-74, Aug 2016b.

DECKER, M.; ARAND, M.; CRONIN, A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. **Arch Toxicol**, v. 83, n. 4, p. 297-318, Apr 2009.

DEMYDCHUK, Y. et al. Analysis of the tetronomycin gene cluster: insights into the biosynthesis of a polyether tetronate antibiotic. **Chembiochem**, v. 9, n. 7, p. 1136-45, May 2008.

DUFFIELD, T. F. et al. Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 86, n. 4, p. 1171-6, Apr 2003.

DUTTON, C. J.; BANKS, B. J.; COOPER, C. B. Polyether ionophores. **Nat Prod Rep**, v. 12, n. 2, p. 165-81, Apr 1995.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 4, p. 486-501, Apr 2010.

EVANS, P.; MCCOY, A. An introduction to molecular replacement. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 64, n. Pt 1, p. 1-10, Jan 2008.

EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 69, n. Pt 7, p. 1204-14, Jul 2013.

FANG, X. et al. Pathways of epoxyeicosatrienoic acid metabolism in endothelial cells. Implications for the vascular effects of soluble epoxide hydrolase inhibition. **J Biol Chem**, v. 276, n. 18, p. 14867-74, May 2001.

FINNEY, N. S. Enantioselective epoxide hydrolysis: catalysis involving microbes, mammals and metals. **Chem Biol**, v. 5, n. 4, p. R73-9, Apr 1998.

FLEMING, I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. **Circ Res**, v. 89, n. 9, p. 753-62, Oct 2001.

FORSYTHE, E. L.; MAXWELL, D. L.; PUSEY, M. Vapor diffusion, nucleation rates and the reservoir to crystallization volume ratio. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 10 Pt 1, p. 1601-5, Oct 2002.

FUJINO, A. et al. *Bacillus subtilis* epoxide hydrolase-catalyzed preparation of enantiopure 2-methylpropane-1,2,3-triol monobenzyl ether and its application to expeditious synthesis of (R)-bicalutamide. **Tetrahedron Lett**, v. 6, p. 979-983, 2006.

GAL, J. Molecular chirality: language, history, and significance. **Top Curr Chem**, v. 340, p. 1-20, 2013.

GILMORE, K.; ALABUGIN, I. V. Cyclizations of alkynes: revisiting Baldwin's rules for ring closure. **Chem Rev**, v. 111, n. 11, p. 6513-56, Nov 2011.

GOLINSKA, P.; DAHM, H. Enzymatic Activity of Actinomycetes from the Genus *Streptomyces* Isolated from the Bulk Soil and Rhizosphere of the *Pinus sylvestris*. **Dendrobiology**, v. 65, p. 37-46, 2011.

GOMEZ, G. A. et al. Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis. **Biochemistry**, v. 43, n. 16, p. 4716-23, Apr 2004.

GRANDJEAN, J.; LASZLO, P. Solution structure and cation-binding abilities of two quasi-isomorphous antibiotic ionophores M 139603 and tetromycin. **Tetrahedron Lett**, v. 24, p. 3319-3322, 1983.

HAGEL, L. Gel-filtration chromatography. **Curr Protoc Protein Sci**, v. Chapter 8, p. Unit8.3, May 2001.

HAMMOCK, B. D.; GRANT, D.; STORMS, D. **Epoxide Hydrolases**. Comprehensive Toxicology: Pergamon Press, Oxford, 1997. 646.

HARNED, R. L. et al. Nigericin, a new crystalline antibiotic from an identified *Streptomyces*. **Antibiot Chemoter**, p. 594-596, 1951.

HAYES, D. P.; PFEIFFER, D. U.; WILLIAMSON, N. B. Effect of intraruminal monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. **J Dairy Sci**, v. 79, n. 6, p. 1000-8, Jun 1996.

HEIKINHEIMO, P. et al. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. **Structure**, v. 7, n. 6, p. R141-6, Jun 1999.

HEMDAN, E. S. et al. Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 6, p. 1811-5, Mar 1989.

HOLM, L.; ROSENSTRÖM, P. Dali server: conservation mapping in 3D. **Nucleic Acids Res**, v. 38, p. W545-9, Jul 2010.

HOTTA, K. et al. Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring closure in polyether biosynthesis. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 355-8, Mar 2012.

IMIG, J. D. et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. **Hypertension**, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 690-4, Feb 2002.

JACOBS, M. H. et al. Characterization of the epoxide hydrolase from an epichlorohydrin-degrading *Pseudomonas* sp. **Eur J Biochem**, v. 202, n. 3, p. 1217-22, Dec 1991.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 125-32, Feb 2010.

KANTARDJIEFF, K. A.; RUPP, B. Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. **Protein Sci**, v. 12, n. 9, p. 1865-71, Sep 2003.

KATAOKA, R. et al. Biodegradation of dieldrin by a soil fungus isolated from a soil with annual endosulfan applications. **Environ Sci Technol**, v. 44, n. 16, p. 6343-9, Aug 2010.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J Mol Biol**, v. 372, n. 3, p. 774-97, Sep 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LATHE, G. H.; RUTHVEN, C. R. The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. **Biochem J**, v. 60, n. 4, p. xxxiv, Aug 1955.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica**. Sarvier, 1250p, 2013.

LENFANT, N. et al. ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. **Nucleic Acids Res**, v. 41, p. D423-9, Jan 2013.

LIN, S. et al. Characterization of the SgcF epoxide hydrolase supporting an (R)-vicinal diol intermediate for enediyne antitumor antibiotic C-1027 biosynthesis. **J Am Chem Soc**, v. 131, n. 45, p. 16410-7, Nov 2009.

LIN, S.; HORSMAN, G. P.; SHEN, B. Characterization of the epoxide hydrolase NcsF2 from the neocarzinostatin biosynthetic gene cluster. **Org Lett**, v. 12, n. 17, p. 3816-9, Sep 2010.

MARCO-URREA, E.; GARCÍA-ROMERA, I.; ARANDA, E. Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. **N Biotechnol**, v. 32, n. 6, p. 620-8, Dec 2015.

MATHIS, G. et al. Effect of Lasalocid or Salinomycin administration on performance and immunity following coccidia vaccination of commercial broilers. **J Appl Poultry Res**, p. 577-585, 2014.

MATSUMURA, F.; BOUSH, G. M. Degradation of insecticides by a soil fungus, *Trichoderma viride*. **J Econ Entomol**, v. 61, n. 3, p. 610-2, Jun 1968.

MCCONATHY, J.; OWENS, M. J. Stereochemistry in Drug Action. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry**, v. 5, n. 2, p. 70-73, Apr 2003.

MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, Aug 2007.

MEHLHORN, H.; POOCH, H.; RAETHER, W. The action of polyether ionophorous antibiotics (monensin, salinomycin, lasalocid) on developmental stages of *Eimeria tenella* (Coccidia, Sporozoa) in vivo and in vitro: study by light and electron microscopy. **Z Parasitenkd**, v. 69, n. 4, p. 457-71, 1983.

MEIJER, J.; DEPIERRE, J. W. Cytosolic epoxide hydrolase. **Chem Biol Interact**, v. 64, n. 3, p. 207-49,

MIGITA, A. et al. Identification of a gene cluster of polyether antibiotic lasalocid from *Streptomyces lasaliensis*. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 73, n. 1, p. 169-76, Jan 2009.

- MINAMI, A. et al. Enzymatic epoxide-opening cascades catalyzed by a pair of epoxide hydrolases in the ionophore polyether biosynthesis. **Org Lett**, v. 13, n. 7, p. 1638-41, Apr 2011.
- MIYAZAKI, Y. et al. Salinomycin, a new polyether antibiotic. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 27, n. 11, p. 814-21, Nov 1974. I
- MOGHADDAM, M. F. et al. Bioactivation of leukotoxins to their toxic diols by epoxide hydrolase. **Nat Med**, v. 3, n. 5, p. 562-6, May 1997.
- MOHANRAJ, G.; SEKAR, T. Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potencial to produce antimicrobials. **Int J Life Sci Pharma Res**, v. 2, p. 115-126, 2013.
- MONFORT, N.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R. Enzymatic transformations. Part 55: Highly productive epoxide hydrolase catalysed resolution of an azole antifungal key synthon. **Tetrahedron**, v. 3, p. 601-605, 2004.
- MONTERDE, M. I. et al. Enzymatic transformations. Part 58: Enantio Convergent bio hydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, p. 2801-2805, 2004.
- MORISSEAU, C. Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism. **Biochimie**, v. 95, n. 1, p. 91-5, Jan 2013.
- MORISSEAU, C. et al. Structural refinement of inhibitors of urea-based soluble epoxide hydrolases. **Biochem Pharmacol**, v. 63, n. 9, p. 1599-608, May 2002.
- MOWBRAY, S. L. et al. X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes. **Protein Sci**, v. 15, n. 7, p. 1628-37, Jul 2006.
- NARDINI, M. et al. The x-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. An enzyme to detoxify harmful epoxides. **J Biol Chem**, v. 274, n. 21, p. 14579-86, May 1999.
- NEWMAN, J. W.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. **Prog Lipid Res**, v. 44, n. 1, p. 1-51, Jan 2005.
- NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, T. V. Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. **Pesqui Vet Bras**, v. 29, p. 191-197, 2009.
- NOVILLA, M. N. **Ionophores**. Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Academic Press, 2012.

PAILLASSE, M. R. et al. Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles. **J Lipid Res**, v. 53, n. 4, p. 718-25, Apr 2012.

PARKER, R. E.; ISAACS, N. S. Mechanism of epoxide reactions. **Chem Rev**, v. 4, p. 737-799, 1959.

PATRA, A. K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. **Environ Monit Assess**, v. 184, n. 4, p. 1929-52, Apr 2012.

PEDRAGOSA-MOREAU, S.; ARCHELAS, A.; FURTOSS, R. Microbial Transformations. 31. Synthesis of enantiopure epoxides and vicinal diols using fungal epoxide hydrolase mediated hydrolysis. **Tetrahedron Lett**, p. 3319-3322, 1996.

PORATH, J. et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 598-9, Dec 1975.

PORATH, J.; FLODIN, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. **Nature**, v. 183, n. 4676, p. 1657-9, Jun 1959.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annu Rev Biochem**, v. 45, p. 501-30, 1976.

PRESSMAN, B. C. et al. Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 58, n. 5, p. 1949-56, Nov 1967.

RHODES, G. **Crystallography Made Crystal Clear - A Guide for Users of Macromolecular Models**. Third Edition. Academic Press Elsevier, 352p, 2006.

RINK, R. et al. Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. **J Biol Chem**, v. 272, n. 23, p. 14650-7, Jun 1997.

RINK, R. et al. Tyrosine residues serve as proton donor in the catalytic mechanism of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*. **Biochemistry**, v. 39, n. 18, p. 5600-13, May 2000.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-4, Jul 2014.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 1, p. 65-74, Apr 2003.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Appl Environ Microbiol**, v. 55, n. 1, p. 1-6, Jan 1989.

SENTHILKUMAR, S. et al. Biodegradation of methyl parathion and endosulfan using *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichoderma viridae*. **J Environ Sci Eng**, v. 53, n. 1, p. 115-22, Jan 2011.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Curr Opin Chem Biol**, v. 7, n. 2, p. 285-95, Apr 2003.

SHICHIJO, Y. et al. Epoxide hydrolase Lsd19 for polyether formation in the biosynthesis of lasalocid A: direct experimental evidence on polyene-polyepoxide hypothesis in polyether biosynthesis. **J Am Chem Soc**, v. 130, n. 37, p. 12230-1, Sep 2008.

SHUMARD, R. F.; CALLENDER, M. E. Monensin, a new biologically active compound. VI. Anticoccidial activity. **Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)**, v. 7, p. 369-77, 1967.

SIENEL, G.; RIETH, R.; ROWBOTTOM, K. T. **Epoxides**. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Wiley-VCH, 2014.

SMITH, C. K.; GALLOWAY, R. B. Influence of monensin on cation influx and glycolysis of *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. **J Parasitol**, v. 69, n. 4, p. 666-70, Aug 1983.

SMITH, C. K.; GALLOWAY, R. B.; WHITE, S. L. Effect of ionophores on survival, penetration, and development of *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. **J Parasitol**, v. 67, n. 4, p. 511-6, Aug 1981.

SMITH, L. et al. Analysis of specific mutants in the lasalocid gene cluster: evidence for enzymatic catalysis of a disfavoured polyether ring closure. **Chembiochem**, v. 9, n. 18, p. 2967-75, Dec 2008.

SMITH, W. H. Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (Xenobiotic) degradation. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 32, n. 2, p. 179-83, Nov 1995.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **Bioessays**, v. 10, n. 5, p. 170-5, May 1989.

TANAKA, D. et al. A practical use of ligand efficiency indices out of the fragment-based approach: ligand efficiency-guided lead identification of soluble epoxide hydrolase inhibitors. **J Med Chem**, v. 54, n. 3, p. 851-7, Feb 2011.

TAYLOR, R. W.; KAUFFMAN, R. F.; PFEIFER, D. R. **Cation complexation and transport by carboxylic acid ionophores**. Polyether Antibiotics: Marcel Dekker, New York, 1982.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **J Environ Qual**, v. 32, n. 5, p. 1591-602, 2003 Sep-Oct 2003.

TERWILLIGER, T. C. et al. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 65, n. Pt 6, p. 582-601, Jun 2009.

TEWARI, A. K.; MAHARANA, B. R. Control of poultry coccidiosis: changing trends. **J Parasit Dis**, v. 35, n. 1, p. 10-7, Jun 2011.

TONIOLO, C.; BENEDETTI, E. The polypeptide 310-helix. **Trends Biochem Sci**, v. 16, n. 9, p. 350-3, Sep 1991.

UEBERBACHER, B. J. et al. A Chemoenzymatic, Enantioconvergent, Asymmetric Total Synthesis of (R)-Fridamycin E. **Eur J Org Chem**, v. 2005, p. 1266-1270, 2005.

VAN DER WERF, M. J.; OVERKAMP, K. M.; DE BONT, J. A. Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. **J Bacteriol**, v. 180, n. 19, p. 5052-7, Oct 1998.

VAN DER WERF, M. J.; SWARTS, H. J.; DE BONT, J. A. *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 5, p. 2092-102, May 1999.

VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D. C.; SCHETTERS, T. P. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Vet Parasitol**, v. 100, n. 1-2, p. 13-20, Sep 2001.

VILOTIJEVIC, I.; JAMISON, T. F. Epoxide-opening cascades in the synthesis of polycyclic polyether natural products. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 48, n. 29, p. 5250-81, 2009.

WESTLEY, J. W. Antibiotic Structure and Biosynthesis. **J Nat Prod**, v. 49, p. 35-47, 1986.

WESTLEY, J. W. et al. Isolation of novel antibiotics X-14667A and X-14667B from *Streptomyces cinnamonensis* subsp. *urethanofaciens* and their characterization as 2-phenethylurethanes of monensins B and A. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 34, n. 10, p. 1248-52, Oct 1981.

WILSON, C. et al. Structure of a soluble epoxide hydrolase identified in *Trichoderma reesei*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1865, n. 8, p. 1039-1045, Aug 2017.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 235-42, Apr 2011.

WIXTROM, R. N.; HAMMOCK, B. D. **Membrane-bound and soluble-fraction epoxide hydrolases: methodological aspect.** Biochemical Pharmacology and Toxicology: John Wiley & Sons, Inc, New York, US, 1985. 1-93.

WONG, F. T. et al. Epoxide hydrolase-lasalocid a structure provides mechanistic insight into polyether natural product biosynthesis. **J Am Chem Soc**, v. 137, n. 1, p. 86-9, Jan 2015.

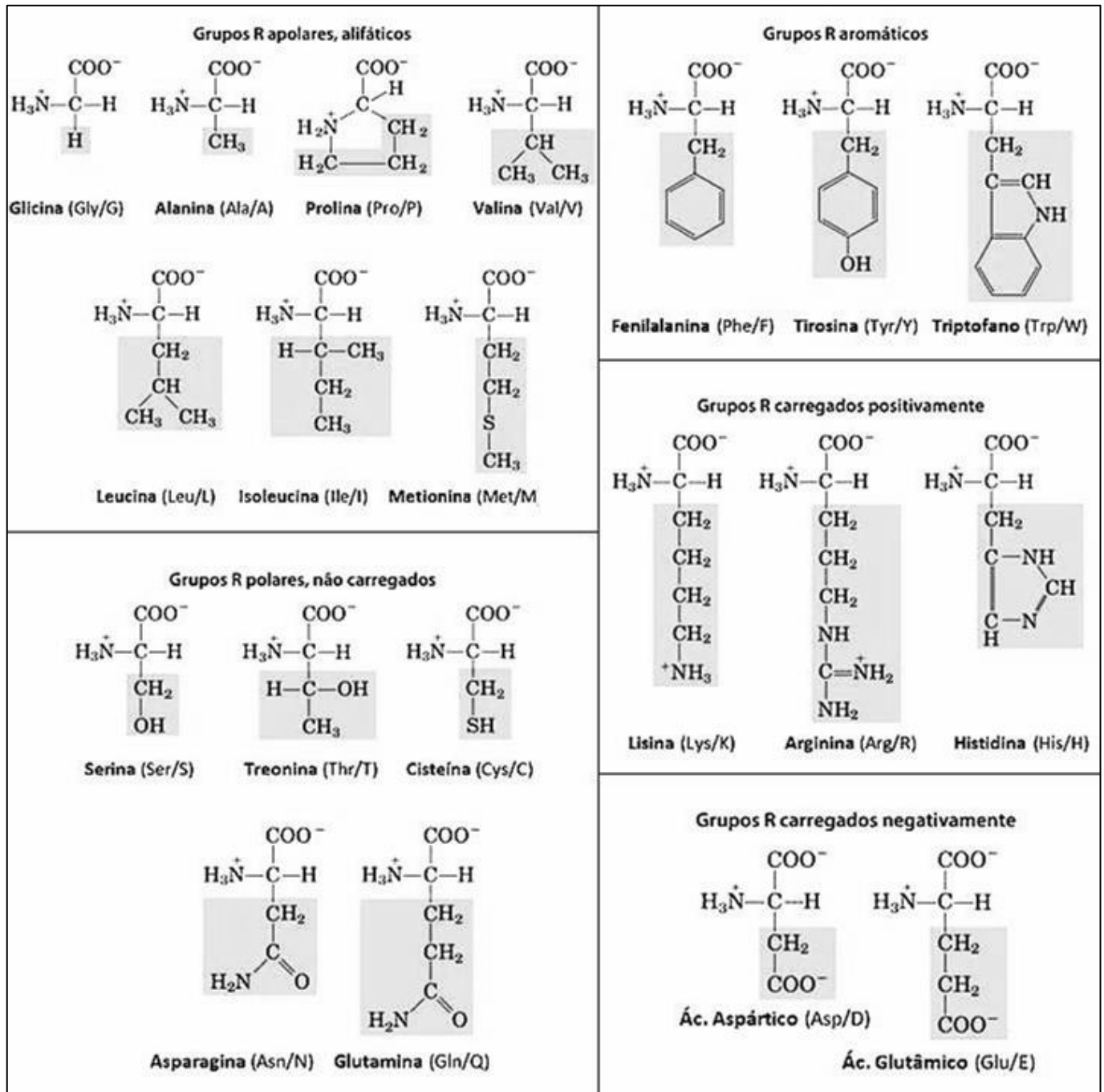
YU, J. et al. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 46-52, Jan 2010.

ZOCHER, F. et al. Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains. **J Biotechnol**, v. 77, n. 2-3, p. 287-92, Feb 2000.

ZOU, J. et al. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. **Structure**, v. 8, n. 2, p. 111-22, Feb 2000.

VII – ANEXOS

ANEXO A – Aminoácidos, símbolos e abreviações



Fonte: Adaptado pelo autor a partir de Lehninger *et al.*, 2013.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Proteins and Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapapStructure of a soluble epoxide hydrolase identified in *Trichoderma reesei*

Carolina Wilson^{a,b}, Gabriel S. De Oliveira^c, Patrícia P. Adriani^c, Felipe S. Chambergo^c,
Marcio V.B. Dias^{a,b,*}

^a Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^b Programa de Pós Graduação em Microbiologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil^c Escola de Artes, Ciências e Humanidades, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Epoxide hydrolase

Biocatalysis

Trichoderma

ABSTRACT

Epoxide hydrolases (EHs) are enzymes that have high biotechnological interest for the fine and transformation industry. Several of these enzymes have enantioselectivity, which allows their application in the separation of enantiomeric mixtures of epoxide substrates. Although two different families of EHs have been described, those that have the α/β -hydrolase fold are the most explored for biotechnological purpose. These enzymes are functionally very well studied, but only few members have three-dimensional structures characterised. Recently, a new EH from the filamentous fungi *Trichoderma reesei* (TrEH) has been discovered and functionally studied. This enzyme does not have high homology to any other EH structure and have an enatiopreference for (S)-(–) isomers. Herein we described the crystallographic structure of TrEH at 1.7 Å resolution, which reveals features of its tertiary structure and active site. TrEH has a similar fold to the other soluble epoxide hydrolases and has the two characteristic hydrolase and cap domains. The enzyme is predominantly monomeric in solution and has also been crystallised as a monomer in the asymmetric unit. Although the catalytic residues are conserved, several other residues of the catalytic groove are not, and might be involved in the specificity for substrates and in the enantioselectivity of this enzyme. In addition, the determination of the crystallographic structure of TrEH might contribute to the rational site direct mutagenesis to generate an even more stable enzyme with higher efficiency to be used in biotechnological purposes.

1. Introduction

The use of enzymes as biocatalyst tools has transformed the biotechnological industry in the last decades [1,2]. The application of enzymes becomes even more important with the increase of its catalytic efficiency and substrate specificity. The molecular and structural biology and enzymology had a strong impact to improve the key characteristic of enzymes for industrial purposes [2]. These molecular techniques promoted the simplification of production and purification of recombinant enzymes in large quantities and the engineering of activity through site directed mutagenesis had dramatically increased the enzymatic efficiency [2]. Epoxide Hydrolases (EHs) are one example among the several types of enzymes, which molecular techniques can be applied in the transformation industry, which could be demonstrated by the vast literature in the last years that describes the applications of these enzymes, including those that occur naturally or are results from genetic engineering [3–5]. Epoxides are cyclic ethers formed by a three atoms ring from the oxidation of olefins or alkenes, which are aliphatic hydrocarbons with at least one double bond

between the carbons. Generally, epoxides are very reactive groups because the electronegativity of the oxygen combined with a high level of deformation of the three atoms ring [6].

Naturally, EHs are enzymes that have several biological roles, which differ in each organism. However, these enzymes have at least three main functions including detoxification, catabolism, and regulation of signaling molecules [7,8]. Generally, EHs catalyse the opening of epoxide groups converting them to vicinal trans-dihydrodiols [9,10]. EH substrates are structurally diverse and represent a wide range of xenobiotic epoxide derivatives, such as those formed by *in vivo* oxidation of aromatic hydrocarbons as stilbene and styrene [10,11]. EHs open epoxide substrates using only a water molecule as a co-substrate, which could be even considerate as a co-factor in free enzymes [6]. EHs can be found spread in nature, including members in bacteria, fungi, plants and mammals [7,12]. Several EHs have high enantioselectivity and consequently catalyse the hydrolysis of a unique enantiomer [6]. In addition, several EHs also show high regioselectivity for one of the oxirane carbon of the epoxide group [6]. All these characteristics make the applicability of epoxide hydrolase very

* Corresponding author at: Av. Lineu Prestes, 1374, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo-SP, Zip code 05508-000, Brazil.
E-mail address: mvbldias@usp.br (M.V.B. Dias).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.004>

Received 2 March 2017; Received in revised form 14 April 2017; Accepted 8 May 2017
1570-9639/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

appealing to the transformation industry, such as pharmaceutical, in preparation of enantiopure epoxide derivatives from racemic mixtures of epoxides [3].

Structurally, EHs are classified into two distinct families:

1) α/β hydrolase like EHs: these enzymes are characterised to have a topology similar to that of haloalkene dehalogenase [13] and various member have already their three-dimensional structure characterised, including from bacteria [14,15], fungi [16], plants [17] and mammals [17–19]. The α/β hydrolase like EHs can be further classified into soluble epoxide hydrolases (sEHs) and microsomal epoxide hydrolases (mEHs) according to whether this protein is found in the cytosol or secreted, or located predominantly in the endoplasmic reticulum, respectively [9,20]. Both sEHs and mEHs have the same characteristic folding, which is constituted by two domains: the hydrolase domain, composed by a very conserved central β -sheet surrounded by α -helices and, a less conserved domain, or cap domain, which is positioned on the top of the substrate binding site and generally is formed by α -helices [15]. The active site of these EHs has a characteristic catalytic triad constituted by Asp/Ser/Cys-His-Asp/Glu (nucleophile-histidine-acid) situated on the top of the hydrolase domain loops [19]. In addition, two tyrosine residues located in the cap domain are also crucial for the activity. These residues are responsible to attack the oxygen group of the epoxide substrates [21]. 2) The second family of EH includes the Limonene-1,2- like Epoxide Hydrolases (LEHs): These EHs are call so because the first member to have its three-dimensional structure was Limonene-1,2-Epoxide Hydrolase (LEH) from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 [22–24], which has a distinct fold and catalytic mechanism from α/β hydrolase EHs [23]. In general, this class of EHs has a unique domain constituted by three α -helices and six β -sheets resembling to a cone. The cavity forms a large substrate binding pocket and in the deepest point is located the active site, which is formed by several conserved residues [23]. Differently of the α/β hydrolase EHs, the catalysis of LEHs involve a push-pull mechanism and occurs in two steps [23]. Although the first member of this family has been found in *Rhodococcus erythropolis*, structures of several other members from different organisms have been characterised, including members found in *M. tuberculosis* and in the biosynthesis of polyether natural products [25,26].

Although both families of EHs can be used in biotechnological applications, members of α/β hydrolase EHs are more often applied to isolate enantiopure epoxides [27,28]. Consequently α/β hydrolase EHs are more enzymatically studied [28,29] despite its mechanism of enantioselectivity are also not completely understood and only few member from fungi have three-dimensional structures limiting the applicability of site directed mutagenesis. Recently, an EHs from the fungi *Trichoderma reesei* (TrEH) was kinetically characterised [30,31]. Interestingly, this enzyme has been proved to have a high enantioselectivity since *in vitro* experiments using styrene oxide as substrate have indicated that that enzyme is more efficient to hydrolyse (S)-(-)-styrene oxide than its (R)-(+)-enantiomer [30]. In addition, TrEH also has been shown to be very stable on drastic conditions of pH and temperature, indicating that enzyme might be a good candidate for biotechnology applications [30].

Herein, we show the crystallographic structure of TrEH, which provides insights about its tertiary and quaternary structures, mechanistic and details of its active site. These data might contribute for experiments of site direct mutagenesis to provide even more stable and more efficient enzymes to be used for the transformation industry.

2. Material and methods

2.1. Cloning, overexpression and purification

The cloning, overexpression and purification of TrEH has been published previously [30]. Briefly, the ORF corresponding to TrEH has been cloned into a pPROEX-HTa plasmid (Life Technologies, USA),

which was used to transform competent *E. coli* BL21(DE3) cells. The cells were grown in LB (Luria Bertani) media and the overexpression was carried out by the induction using IPTG. For the purification, the cells were disrupted and the soluble fraction was separated by centrifugation, which was applied to a HiTrap Chelating HP (GE Healthcare, USA) affinity column connected to a FPLC ÄKTA (GE Healthcare, USA) system. For crystallographic proposal, the used binding buffer (Buffer A) contained 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl and 50 mM imidazole, pH 7.5. A linear gradient of 50–300 mM imidazole was run with the elution buffer (Buffer B consists of buffer A plus 300 mM imidazole) to elute the proteins bound to the column. The purity and molecular mass of the protein was evaluated by SDS-PAGE using denaturing conditions.

2.2. Crystallisation trials

TrEH was concentrated up to 13 mg/mL and the sample was subjected to the vapour diffusion crystallisation method using 96-well plates for sitting drop technique. The protein was screened against different crystallisation kits (Hampton Research and Jena Bioscience) using an Oryx 4 robot (Douglas Instruments, UK) and the final drops had a volume of 0.6 μ L with a ratio of 0.3/0.3 of protein and crystallisation solution. The plates were storage at 18 °C. After obtaining the first hits, the conditions containing the best crystals were manually refined also using vapour diffusion crystallisation method through hanging drop crystallisation technique using 24-wells Linbro plates. The condition that resulted in the best thick plate crystals contained 50 mM 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS), pH 6.5, 40 mM potassium bromide and 44.6% PEG 4000 and the crystals appeared after 1–2 days.

2.3. Data processing and structure resolution

TrEH crystals were diffracted at PETRA-III/DESY, Hamburg – Germany. All the X-ray diffraction data were processed and analysed using XDS [32], which was scaled by the program Aimless [33] from CCP4i suite [34]. The number of molecules in the asymmetric unit was estimated using the Matthews Coefficient program also from CCP4i suite [34]. TrEH structure was solved by molecular replacement using the human liver soluble epoxide hydrolase (PDB entry 3ANS) as a search model [18,35] through of the program Phaser [36] also from CCP4i suite [34]. The refinement of TrEH was carried out using the program phenix.refine [37] from PHENIX suite [38]. The visual inspection and manual building were performed using the program COOT [39]. High quality figures were prepared using the program PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC [39]. The stereochemistry quality of the structure was verified using the program MolProbity [40].

3. Results and discussion

Soluble epoxide hydrolase from *Trichoderma reesei* (TrEH) was annotated by a project of “Joint Genome Institute” [41] and its activity has been characterised by Oliveira et al., 2016 [30]. TrEH indicated to have a preference to hydrolyse isomers (S)-(-) [41]. TrEH has been crystallised in the space group P2₁2₁2 and the crystals have diffracted up to 1.7 Å resolution with a single monomer in the asymmetric unit, which agrees to the molecular weight obtained by analytic gel filtration (Fig. S1), where TrEH also eluted predominantly as a monomer. At least at our knowledge, this is first monomeric sEH to have its three-dimensional structure characterised, in contrast to the dimeric epoxide hydrolases identified in various other organisms [14,17–19]. However, the profile of the analytical gel filtration analysis also suggests that a small fraction of the protein eluted as dimers. The analysis of the crystal packing of TrEH using the program PISA [42] indicates that just a small putative interaction surface between two adjacent protomers can be

Table 1
Data collection and crystallographic statistics for TrEH.

PDB ID	SURO
Wavelength	0.97
Resolution range	44.32–1.7 (1.76–1.7)
Space group	P 21 21 2
Unit cell	51.43 78.28 87.38 90 90 90
Total reflections	508,661 (49133)
Unique reflections	39,388 (3812)
Multiplicity	12.9 (12.9)
Completeness (%)	100 (99)
Mean I/sigma(I)	26.58 (1.34)
Wilson B-factor	33.79
R-merge	0.049 (1.48)
R-meas	0.05 (1.54)
CC1/2	1 (0.86)
CC*	1 (0.96)
Reflections used in refinement	39,333 (3802)
Reflections used for R-free	1998 (193)
R-work	0.18 (0.37)
R-free	0.21 (0.39)
CC(work)	0.96 (0.85)
CC(free)	0.96 (0.75)
Number of non-hydrogen atoms	2831
macromolecules	2645
ligands	7
Protein residues	336
RMS(bonds)	0.007
RMS(angles)	1.07
Ramachandran favored (%)	97
Ramachandran allowed (%)	2.1
Ramachandran outliers (%)	0.6
Rotamer outliers (%)	0
Clashscore	2.67
Average B-factor	42.01
macromolecules	41.85
ligands	49.10
solvent	44.09

In parenthesis are shown the values for the highest resolution shell.

formed through a 2-fold symmetry. This putative dimerisation interface has an area of about 620 Å² and has an extensive number of ionic interactions (15 in the total) and 15 additional hydrogen interactions. This interface is completely different to the other sEHs and suggests that TrEH might have a monomer/dimer equilibrium in solution that renders a new quaternary structure for sEHs (Fig. S3). However, further analytical experiments are needed to elucidate whether this dimer really

exist or this is only an artefact of high protein concentration used during the protein preparation.

TrEH structure was solved by molecular replacement using as a search model the structure of C-terminal domain of human soluble epoxide hydrolase (sEH)(PDB entry 3ANS) [18,35], which has an identity of about 30% to TrEH. The final model of TrEH has 336 residues and 179 water molecules with a R_{factor} and R_{free} of 18.3% and 21.1%, respectively. Further X-ray data, crystallographic statistics and stereochemistry structure analysis are included in the Table 1.

At least to our knowledge, this is the first structure of a sEH from a fungi, since only the mEH from *Aspergillus niger* has been structurally characterised [16]. The rmsd for both TrEH and *A. niger* mEH is 2.2 Å demonstrating that, despite these enzymes have the same fold, they are not very similar. On the other hand, TrEH is similar to other sEHs, such as those from *M. tuberculosis* (PDB ID 2EJ3) [14], potato (PDB ID 4UBH) [17], murine (PDB ID 1CQZ) [19] and human [18] (PDB ID 3ANS), which have a rmsd of about 1.6 Å.

In contrast to human and murine sEHs and similar to *Mycobacterium tuberculosis* and potato sEHs, TrEH does not have a N-terminal domain that resemble to haloacid dehalogenase [18], although the sEH with higher identity (about 30%) to TrEH is the EH domain of human enzyme (Fig. S2). A search using the online server DALI [43] also rendered the human sEH with higher score for the three-dimensional superposition with a Z score of 40.5, in contrast to murine sEH (37.2), *M. tuberculosis* (35.4) and potato (34.1).

TrEH has the same characteristic fold of other solved sEHs, constituted of two domains, an α/β hydrolase domain and a cap domain [19]. The α/β hydrolase domain is topologically similar to those of other epoxide hydrolases and it is composed of a twisted eight-stranded β -sheet. The two first strand are antiparallel and the remaining ones are parallels. Additionally, this β -sheet is sandwiched by five α -helices, being two in one side and three in another side of the β -sheet. The cap domain is constituted only by α -helices, which is also similar to the cap domain of other epoxide hydrolases. However, this region is largely variable in all solved structures and should be responsible for the substrate recognition. This domain has seven α -helices and long loop regions that are more flexible than the hydrolase domain and might have conformational changes on the binding of substrates (Fig. 1a).

3.1. Active site groove

The active site of TrEH is located in a large groove of about 30 Å

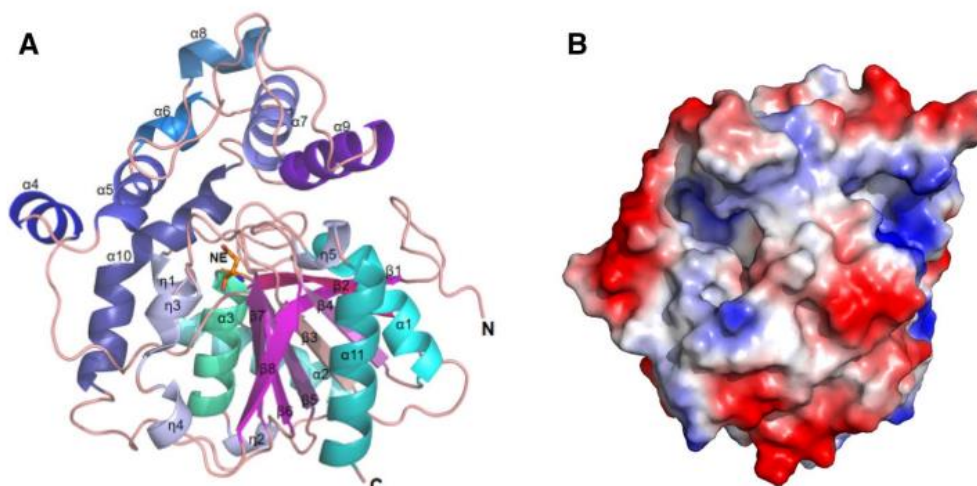


Fig. 1. Structure of TrEH. (A). Three-dimensional structure of TrEH. In green, pink and light blue are represented the secondary structure elements of hydrolase domain and blue and purple are the secondary structure elements of cap domain. NE is the nucleophilic elbow, where it is located the catalytic aspartate 116 (B) Electrostatic surface of TrEH. In red are represented the negative, in blue, the positive and white neutral charges.

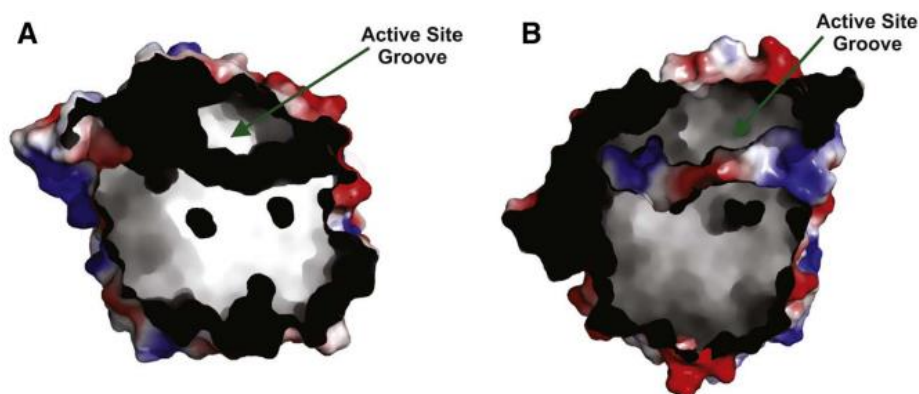


Fig. 2. Active site groove of TrEH. (A) In black is represented the active cavity of TrEH; (B) The representation of the active site shown that its entrance is positively charged and its deeper point is negative charged.

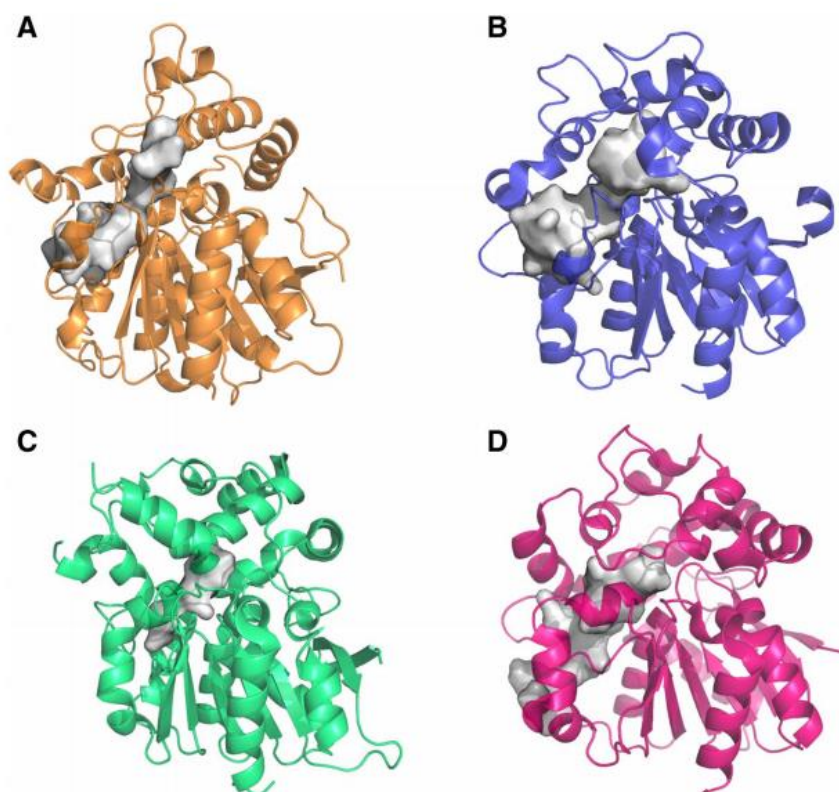


Fig. 3. Volume of the active site of different epoxide hydrolases. (A) TrEH; (B) human sEH; (C) *M. tuberculosis* sEH; (D) potato sEH. The representation of the active site surfaces were calculated using the program POCASA [44].

between the hydrolase and cap domain, which is constituted by residues of both domains (Fig. 2). As observed in other sEHs, the deeper point of the active site cavity of TrEH has a predominance of negative charges, in contrast to the active site entrances that are positively charged (Fig. 2b). In addition, the overall surface of the enzyme is also predominately negative charged (Fig. 1). TrEH also has a substrate-binding pocket resembling an “L” shape tunnel, although it is smaller than human and potato sEH active site, but much larger than *M. tuberculosis* (Fig. 3) sEH.

Using the program POCASA 1.1 [44], we have calculated the active site volumes of TrEH, human, potato and tuberculosis sEHs, which are 2350 Å³, 3175 Å³, 3188 Å³ and 817 Å³, respectively. This result also indicates that TrEH has a smaller cavity than human and potato sEHs,

but has a wider cavity of *M. tuberculosis* sEH. As the volume cavity of these enzymes are different, these enzymes may accept different epoxide substrates.

3.2. Active site residues

TrEH has the characteristic conserved catalytic triad of α/β hydrolases, which is located in the hydrolase domain. This triad is constituted by Asp116 that forms part of the nucleophilic elbow (loop between the strand β 5 and helix α 3), the general base His313 located in the loop between β 8 and η 5 and the Asp286 located in the loop between β 7 and η 3. In addition, TrEH also has the two conserved tyrosines, Tyr167 and Tyr252 in the α 5 and α 10, respectively on the cap domain,

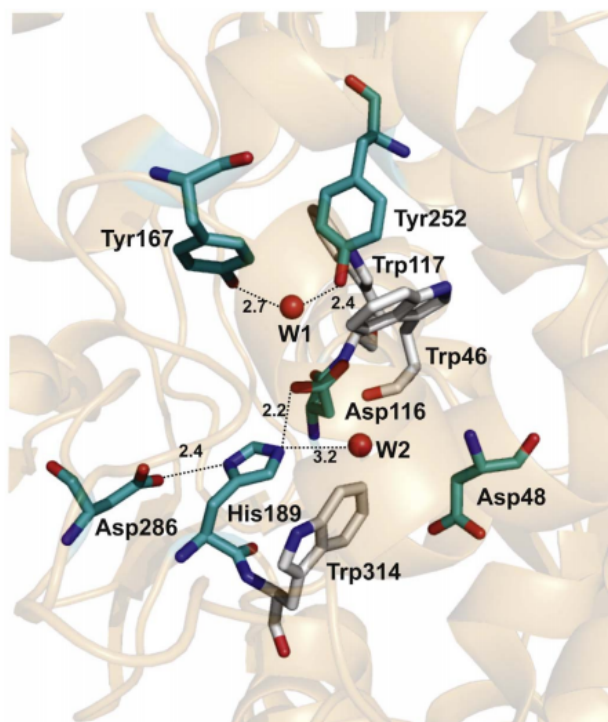


Fig. 4. TrEH active site residues. The residues in green are those that should participate in catalysis of TrEH. Tryptophans are represented in white and should orientate the residues involved in the catalysis. W1 is the water molecule that mimics the position of the oxygen of epoxide group and W2 is the catalytic water, which should be activated by His189.

which are responsible to orientate the oxygen of the substrate epoxide group (Figs. 1 and 4). These two residues are involved in the formation of an oxyanion from the oxygen of substrate epoxide group and have demonstrated to be essential for the activity of the enzyme [21]. We have observed a water molecule in TrEH structure that is positioned at the same position of the oxygen of substrate epoxide group and it makes hydrogen interactions with both tyrosine residues (Fig. 4). In addition, as observed in other sEHs, the active site also has a conserved water molecule that should act as a nucleophile during the second step of the hydrolysis reaction (Fig. 4). This water makes hydrogen interaction with side chain of His313, which activates it for the nucleophilic attack to one of the carbons of the epoxide group. Asp286 should orientate the side chain of His313 for the activation of the water molecule. Although, in all other structures this water further interacts with a second acid residue, generally a glutamate, which should also contribute in its orientation, in TrEH, the corresponding residue, Asp48 has a different angle and is not interacting with this water (Fig. 4). Interesting, TrEH active site has further three tryptophans (46, 117 and 314), which are conserved or are substituted by phenylalanines in other sEH structures and should have a role in orientating the position of His313 and Tyr252 during the enzyme catalysis.

However, due to the low identity of TrEH with other sEHs, the active site cavity has several residues that are not conserved in comparison to other sEHs. These residues may be involved in substrate specificity or in the enzyme enantioselectivity. The superposition of TrEH and the sEHs from human, potato and *M. tuberculosis* shows that these differences cause changes in the active site cavity and should alter their volumes as showed above. Key differences are observed in the hydrolase domain, which generally is more conserved than the cap domain, as for example, Trp46 and Leu171, which are relatively close of the catalytic triad and Tyr252. These two residues are conserved phenylalanines in the other sEHs (Fig. 4b). The probable role for Trp46 and

Leu171 should be the orientation of the correct position of Tyr252 to interact with the oxygen from the substrate epoxide group and consequently they might have some effect in the enantioselectivity of TrEH.

Based in the conserved active site residues, TrEH possibly has a similar catalytic mechanism that has been described in other sEHs and involves a S_N2 nucleophilic attack by a two-step reaction for opening and hydrolysing the epoxide group to render the corresponding vicinal diol product. Asp116 may be involved in the first step of the reaction and should attack a carbon of the epoxide substrate forming a covalent alkyl-enzyme intermediate, which is hydrolysed by the second step of the reaction, which involves the activated water by His313 and assisted by Asp286. Tyr167 and Tyr252 should act during the protonation of the transition state for the formation of the ester intermediate. As observed for potato sEH, TrEH has a preference for (S)-(-)-enantiomer substrates and the superposition of the structures of these two different epoxide hydrolases did not show any difference that could clearly explain the preference of these enzymes for this enantiomer. Actually and interesting, these two enzymes have their sequences with lower identity than the others with three-dimensional structures and this also reflects on the active site, which are more divergent between the three compared epoxide hydrolases (Fig. 5). This might indicate that not only the difference of residues should be involved in the enantioselectivity of these enzymes. The binding mode of substrates and small conformational changes should also play some role during the catalysis. However, as the architecture of the active site, including residues of the cap domain, which is not conserved, and the structure flexibility of these proteins might influence in the enantioselectivity, is difficult to obtain insights about the preference of TrEH without the structure in complex with ligands or substrate analogues and a robust study of activity of mutants.

Although we have performed extensive experiments aiming to obtain the structure of TrEH in complex with valpromide (a known inhibitor of EHs) and short epoxide-like substrates as styrene epoxide, we did not have obtained any data with a clear electron density map that we could fit these molecules. On the other hand, the analysis of the active site of TrEH further reveals the presence of an electron density, which does not correspond to any other organic compound used during the preparation and crystallisation of the enzyme (Fig. S4). Thus, this electron density with low occupancy should come from of some ligand co-purified with the enzyme from the *E. coli* extract. The identification of real inhibitors or substrate analogues for this enzyme and consequently the determination of the structure in complex with them should shed lights on the real movement of cap domain loops.

However, based in the similarity of our structure to the previously solved structure of human, potato and *M. tuberculosis* sEHs, the active site of TrEH should not undergo extensively conformational changes. Only small side chain adjustments may occur for better positioning the substrate within the active site during the catalysis. Interestingly, in comparison with other sEHs, TrEH has a long loop between the residues 194 to 213 forming a lid, which seems to be in an open conformation in our structure, since we have obtained the structure as apo form. In contrast, the human sEH (PDB code 3ANS) in complex with a potent inhibitor [35] also show this same segment in a closed conformation as well as the human apo sEH structure [18] (Fig. 6). However, only the structure in complex with substrate analogues or ligands can address the question whether some movement occurs in this region in the presence of substrate. Studies aiming to identify the natural substrates of this enzyme and possible inhibitors are in progress and they will contribute to elucidate details of the mechanistic, enantioselectivity and plasticity of this enzyme.

4. Conclusion

We have obtained the first structure of a soluble epoxide hydrolase from the filamentous fungi *Trichoderma reesei*. This enzyme has a

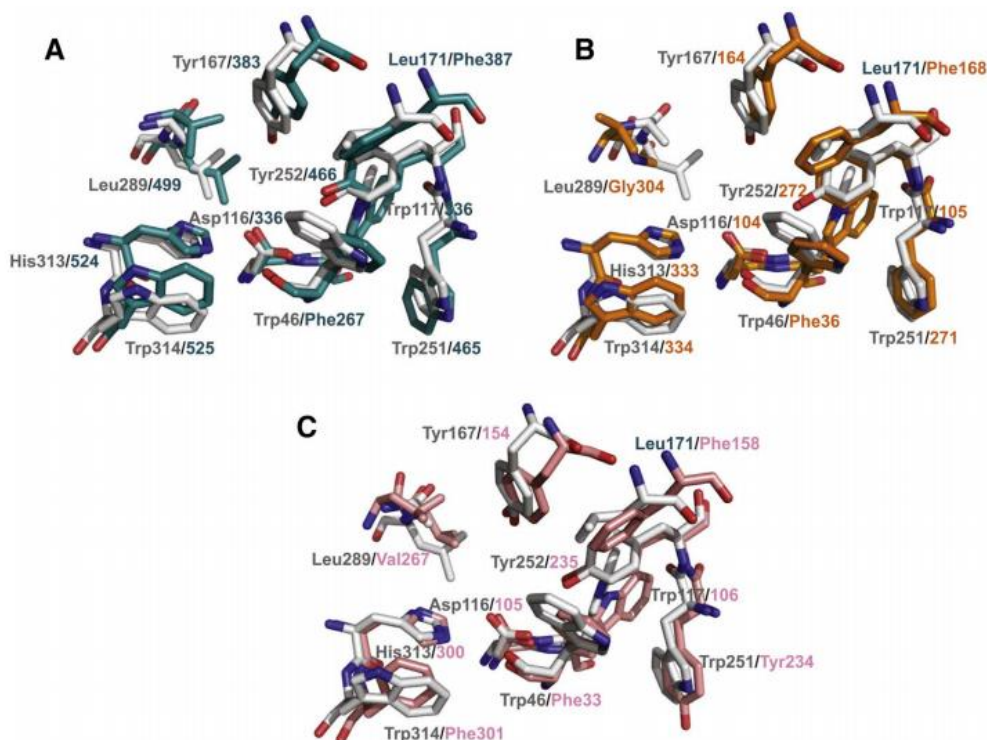


Fig. 5. Active site comparison among different sEHs. TrEH residues are represented in white and labelled in gray. A) Superposition between TrEH and human sEH (green); B) Superposition between TrEH and *M. tuberculosis* sEH (orange); C) Superposition between TrEH and potato sEH (salmon).

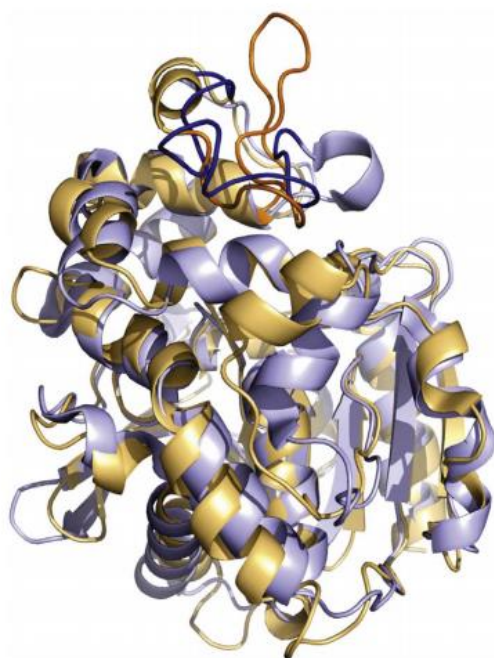


Fig. 6. Putative lid of TrEH. Superposition of TrEH (light yellow) and human sEH (light blue). In orange and blue are highlighted the position of the loop between the residues 194–212 in TrEH and human sEH, respectively.

similar fold to the other solved epoxide hydrolase and α/β hydrolases. TrEH shown to be a predominantly monomeric enzyme with a small fraction of dimers. Although, TrEH has the conserved essential residues for the catalysis, the active site cavity revealed several new features

compared to other enzymes of the same family. The architecture of TrEH active site has important substitutions in comparison with human, potato and *M. tuberculosis* sEHs, which might reflect into the substrate specificity of this enzyme, although we were not able to elucidate the molecular basis of its enantioselectivity for (S)-(-) enantiomers. However, the determination of TrEH structure might contribute to investigate the role of active site residues through site directed mutagenesis. In addition, TrEH structure will also contribute to design a more stable and efficient enzyme to be used for the transformation industry during the process of degradation of xenobiotics or in the separation of compounds containing enantiomeric epoxide mixtures.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.004> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgment

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP grant numbers 2010/15971-3 and 2015/09188-8 for MVBD and 2014/24107-1 for FSC; GSO is supported by a fellowship from FAPESP n° 2015/03329-9; CW and PPA are supported by a CAPES fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.004>.

References

- [1] J. Dordick, *Biocatalysis for Industry*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, 1991.

- [2] S. Galanie, M.S. Siddiqui, C.D. Smolke, Molecular tools for chemical biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 24 (2013) 1000–1009.
- [3] A. Archelas, R. Furstoss, Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 112–119.
- [4] B. van Loo, J. Kingma, M. Arand, M.G. Wubbolts, D.B. Janssen, Diversity and biocatalytic potential of epoxide hydrolases identified by genome analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 2905–2917.
- [5] M. Kotik, A. Archelas, V. Faměrová, P. Oubrechtová, V. Křen, Laboratory evolution of an epoxide hydrolase — towards an enantioconvergent biocatalyst, *J. Biotechnol.* 156 (2011) 1–10.
- [6] E.J. de Vries, D.B. Janssen, Biocatalytic conversion of epoxides, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (2003) 414–420.
- [7] C. Morisseau, B.D. Hammock, Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 311–333.
- [8] C. Morisseau, Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism, *Biochimie* 95 (2013) 91–95.
- [9] A.J. Fretland, C.J. Omiecinski, Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology, *Chem. Biol. Interact.* 129 (2000) 41–59.
- [10] M. Decker, M. Arand, A. Cronin, Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling, *Arch. Toxicol.* 83 (2009) 297–318.
- [11] R. Václavíková, D.J. Hughes, P. Souček, Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): gene, structure, function, and role in human disease, *Gene* 571 (2015) 1–8.
- [12] A. Steinreiber, K. Faber, Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 552–558.
- [13] S.M. Franken, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, B.W. Dijkstra, Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes, *EMBO J.* 10 (1991) 1297–1302.
- [14] B.K. Biswal, C. Morisseau, G. Garen, M.M. Cherney, C. Garen, C. Niu, B.D. Hammock, M.N. James, The molecular structure of epoxide hydrolase B from *Mycobacterium tuberculosis* and its complex with a urea-based inhibitor, *J. Mol. Biol.* 381 (2008) 897–912.
- [15] M. Nardini, L.S. Ridder, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, R. Rink, D.B. Janssen, B.W. Dijkstra, The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. An enzyme to detoxify harmful epoxides, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 14579–14586.
- [16] J. Zou, B.M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S.L. Mowbray, T.A. Jones, Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases, *Structure* 8 (2000) 111–122.
- [17] S.L. Mowbray, L.T. Elfström, K.M. Ahlgren, C.E. Andersson, M. Widersten, X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes, *Protein Sci.* 15 (2006) 1628–1637.
- [18] G.A. Gomez, C. Morisseau, B.D. Hammock, D.W. Christianson, Structure of human epoxide hydrolase reveals mechanistic inferences on bifunctional catalysis in epoxide and phosphate ester hydrolysis, *Biochemistry* 43 (2004) 4716–4723.
- [19] M.A. Argiriadi, C. Morisseau, B.D. Hammock, D.W. Christianson, Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10637–10642.
- [20] S. Saito, A. Iida, A. Sekine, C. Eguchi, Y. Miura, Y. Nakamura, Seventy genetic variations in human microsomal and soluble epoxide hydrolase genes (EPHX1 and EPHX2) in the Japanese population, *J. Hum. Genet.* 46 (2001) 325–329.
- [21] R. Rink, J. Kingma, J.H. Lutje Spelberg, D.B. Janssen, Tyrosine residues serve as proton donor in the catalytic mechanism of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*, *Biochemistry* 39 (2000) 5600–5613.
- [22] F. Barbirato, J.C. Verdoes, J.A. de Bont, M.J. van der Werf, The *Rhodococcus erythropolis* DCL14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases, *FEBS Lett.* 438 (1998) 293–296.
- [23] M. Arand, B.M. Hallberg, J. Zou, T. Bergfors, F. Oesch, M.J. van der Werf, J.A. de Bont, T.A. Jones, S.L. Mowbray, Structure of *Rhodococcus erythropolis* limonene-1,2-epoxide hydrolase reveals a novel active site, *EMBO J.* 22 (2003) 2583–2592.
- [24] M.J. van der Werf, K.M. Overkamp, J.A. de Bont, Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5052–5057.
- [25] K. Hotta, X. Chen, R.S. Paton, A. Minami, H. Li, K. Swaminathan, I.I. Mathews, K. Watanabe, H. Oikawa, K.N. Houk, C.Y. Kim, Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring closure in polyether biosynthesis, *Nature* 483 (2012) 355–358.
- [26] A. Minami, T. Ose, K. Sato, A. Oikawa, K. Kuroki, K. Maenaka, H. Oguri, H. Oikawa, Allosteric regulation of epoxide opening cascades by a pair of epoxide hydrolases in monensin biosynthesis, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 562–569.
- [27] E.E. Ferrandi, C. Sayer, M.N. Isupov, C. Annovazzi, C. Marchesi, G. Iacobone, X. Peng, E. Bonch-Osmolovskaya, R. Wohlgenuth, J.A. Littlechild, D. Monti, Discovery and characterization of thermophilic limonene-1,2-epoxide hydrolases from hot spring metagenomic libraries, *FEBS J.* 282 (2015) 2879–2894.
- [28] W.J. Choi, Biotechnological production of enantiopure epoxides by enzymatic kinetic resolution, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 239–247.
- [29] A. Archelas, G. Lacazio, M. Kotik, Epoxide hydrolases and their application in organic synthesis, in: R.N. Patel (Ed.), *Green Biocatalysis*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2016.
- [30] G.S. de Oliveira, P.P. Adriani, F.G. Borges, A.R. Lopes, P.T. Campana, F.S. Chamberg, Epoxide hydrolase of *Trichoderma reesei*: biochemical properties and conformational characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 569–574.
- [31] G.S. de Oliveira, P.P. Adriani, F.G. Borges, A.R. Lopes, P.T. Campana, F.S. Chamberg, Data set of optimal parameters for colorimetric red assay of epoxide hydrolase activity, *Data Brief* 8 (2016) 436–440.
- [32] W. Kabsch, XDS, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 125–132.
- [33] P.R. Evans, G.N. Murshudov, How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69 (2013) 1204–1214.
- [34] M.D. Winn, C.C. Ballard, K.D. Cowtan, E.J. Dodson, P. Emsley, P.R. Evans, R.M. Keegan, E.B. Krissinel, A.G. Leslie, A. McCoy, S.J. McNicholas, G.N. Murshudov, N.S. Pannu, E.A. Potterton, H.R. Powell, R.J. Read, A. Vagin, K.S. Wilson, Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67 (2011) 235–242.
- [35] D. Tanaka, Y. Tsuda, T. Shiyama, T. Nishimura, N. Chiyo, Y. Tominaga, N. Sawada, T. Mimoto, N. Kusunose, A practical use of ligand efficiency indices out of the fragment-based approach: ligand efficiency-guided lead identification of soluble epoxide hydrolase inhibitors, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 851–857.
- [36] A.J. McCoy, R.W. Grosse-Kunstleve, P.D. Adams, M.D. Winn, L.C. Storoni, R.J. Read, Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (2007) 658–674.
- [37] P.V. Afonine, R.W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J.J. Headd, N.W. Moriarty, M. Mustyakimov, T.C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P.H. Zwart, P.D. Adams, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 352–367.
- [38] T.C. Terwilliger, P.D. Adams, R.J. Read, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R.W. Grosse-Kunstleve, P.V. Afonine, P.H. Zwart, L.W. Hung, Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 65 (2009) 582–601.
- [39] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2126–2132.
- [40] V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 12–21.
- [41] D. Martinez, R.M. Berka, B. Henrissat, M. Saloheimo, M. Arvas, S.E. Baker, J. Chapman, O. Chertkov, P.M. Coutinho, D. Cullen, E.G. Danchin, I.V. Grigoriev, P. Harris, M. Jackson, C.P. Kubicek, C.S. Han, I. Ho, L.F. Larrondo, A.L. de Leon, J.K. Magnuson, S. Merino, M. Misra, B. Nelson, N. Putnam, B. Robbertse, A.A. Salamov, M. Schmoll, A. Terry, N. Thayer, A. Westerholm-Parvinen, C.L. Schoch, J. Yao, R. Barabote, R. Barabote, M.A. Nelson, C. Detter, D. Bruce, C.R. Kuske, G. Xie, P. Richardson, D.S. Rokhsar, S.M. Lucas, E.M. Rubin, N. Dunn-Coleman, M. Ward, T.S. Brettin, Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*), *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 553–560.
- [42] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.
- [43] L. Holm, P. Rosenström, Dali server: conservation mapping in 3D, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) W545–W549.
- [44] J. Yu, Y. Zhou, I. Tanaka, M. Yao, Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere, *Bioinformatics* 26 (2010) 46–52.