



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RENATA ROCHA DE OLIVEIRA

MECANISMO ESTRUTURAL DE REGULAÇÃO ALOSTÉRICA POR POTÁSSIO DA
ENZIMA ADENOSINA QUINASE

*STRUCTURAL MECHANISM OF ALLOSTERIC REGULATION BY POTASSIUM OF THE
ENZYME ADENOSINE KINASE*

CAMPINAS

2019

RENATA ROCHA DE OLIVEIRA

MECANISMO ESTRUTURAL DE REGULAÇÃO ALOSTÉRICA POR POTÁSSIO DA
ENZIMA ADENOSINA QUINASE

*STRUCTURAL MECHANISM OF ALLOSTERIC REGULATION BY POTASSIUM OF THE
ENZYME ADENOSINE KINASE*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Ciências.

*Thesis submitted to the Faculty of Medical Sciences of the State
University of Campinas as part of the application required to obtain a
PhD in Science.*

ORIENTADOR: KLEBER GOMES FRANCHINI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
RENATA ROCHA DE OLIVEIRA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

OL4m Oliveira, Renata Rocha, 1980-
Mecanismo estrutural de regulação alostérica por potássio da enzima adenosina quinase / Renata Rocha de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Kleber Gomes Franchini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adenosina quinase. 2. Regulação alostérica. 3. Potássio. I. Franchini, Kleber Gomes, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Structural mechanism of allosteric regulation by potassium of the enzyme adenosine kinase.

Palavras-chave em inglês:

Adenosine kinase

Allosteric regulation

Potassium

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Kleber Gomes Franchini [Orientador]

Alisson Campos Cardoso

Juliana Ferreira de Oliveira

Danieli Cristina Gonçalves

Everardo Magalhães Carneiro

Data de defesa: 28-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3092-838X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9952174002638466>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RENATA ROCHA DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI**
 - 2. PROF. DR. ALISSON CAMPOS CARDOSO**
 - 3. PROFA. DRA. JULIANA FERREIRA DE OLIVEIRA**
 - 4. PROF. DR. EVERARDO MAGALHÃES CARNEIRO**
 - 5. PROFA. DRA. DANIELI CRISTINA GONÇALVES**
-

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data da defesa: 28/08/2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, que todos os dias em que eu estive longe, foi capaz de me preencher com uma força indescritível mesmo diante de todos os desafios que vivemos. Vocês são fortaleza e diante de tanto esforço e luta, hoje estou aqui para agradecer tudo o que vocês me proporcionaram. Caminhei dia após dia buscando realizar os meus sonhos e aproveitando as oportunidades as quais comecei a buscar desde o dia em que deixei nossa casa, para iniciar o percurso da minha carreira. Hoje com muito orgulho digo que tudo valeu a pena. Nossa conexão e amor me fizeram acreditar sempre que tudo daria certo!

Um eterno obrigado a meus pais, José Olinto e Leila, vocês são meu porto seguro!

Aos meus irmãos Rodrigo e André Luiz, que foram capazes de emanar tanto amor, que até mesmo a distância que nos separa se tornou insignificante.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Olinto e Leila, por me proporcionarem todo o apoio, embasamento e fomento de estudo. Obrigada por toda paciência comigo, obrigada por sempre me ensinarem seus valores, obrigada pela verdade pois ela me faz quem eu sou e quem eu NÃO sou. Aos meus irmãos Rodrigo e André, obrigada pelo carinho e apoio nestes tempos.

Ao meu orientador, Dr. Kleber Gomes Franchini, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, por me abrir tantas portas e principalmente por acreditar em meu trabalho. Obrigada por alimentar meus dias com tantos desafios, novos projetos e por sempre acreditar na minha capacidade.

Aos amigos do grupo PBCV, Maria Luisa, Alisson, Ana Helena, Irene e Raphael que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Só eu sei a importância de cada um de vocês nessa caminhada e o quanto cada ajuda foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada!

Aos companheiros de Anexo, Paula, Karina, Aline, Zeca, Luana, Bianca, Marina, Hozana e Ângela obrigada pela disposição em ajudar, escutar, esclarecer dúvidas e proporcionar tantos momentos que levarei comigo. Vocês tornaram meu trabalho mais alegre, meus dias leves, a jornada mais fácil. Obrigada também pelos momentos de diversão, aventuras, e muitas lutas. São esses os amigos que se um dia se eu tiver que dizer “até breve” será extremamente difícil, mas será necessário pois as carreiras irão se consolidar, e cada um seguirá o destino de sucesso, que certamente está reservado para cada um de vocês.

Aos pesquisadores, Celisa Tonoli, Artur Cordeiro, Maurício Sforça, Silvana Rocco, Raphael Morales, Carla Polo, Gustavo Mercaldi e Mário Murakami, pelas colaborações que permitiram a realização deste trabalho.

À querida Givanil por todos os momentos, não apenas por preparar com todo cuidado e carinho as placas de cristalização, mas também pelas palavras de incentivo todos os dias que eu estive no ROBOLAB.

A todos os pesquisadores, funcionários e colegas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), que tanto apoiaram a realização deste trabalho e sempre estiveram dispostos a compartilhar o conhecimento, e consolidar o meu aprendizado.

Às minhas amigas, verdadeiros presentes que ganhei quando cheguei em Campinas, Dionéia Araldi, Patrícia, Mariana, Cíntia, Marilice, Hima, Carla, Rebeca e Marcela (Vizi). Vocês acompanharam cada etapa dessa conquista e sempre tinham uma palavra de incentivo e um abraço caloroso! Obrigada Amigas!

Agradeço ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e todo o Laboratório Nacional de Pesquisa e Energia dos materiais (CNPEM) por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização desse trabalho.

À Unicamp e a pós-graduação do Departamento de Fisiopatologia Médica da Faculdade de Medicina- FCM. Obrigada!

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e abdicarem de todos os afazeres diários e assim contribuírem para a conclusão desse trabalho. Muito obrigada!

Gratidão aos mentores de luz que operam suas vibrações amorosas sempre para o meu bem!

RESUMO

A adenosina quinase (ADK -EC 2.7.1.20) é uma fosfotransferase responsável pela transferência catalítica do γ -fosfato do ATP para adenosina (ADO). Essa reação desempenha um papel fundamental na regulação de níveis celulares de adenosina e, desta forma, interfere em diversos mecanismos homeostáticos e fisiopatológicos (e.g. inflamação, isquemia, etc). A reação catalítica da ADK, envolve regulação complexa pelos substratos e produtos, bem como por Mg^{2+} e fosfato inorgânico. Apresentamos neste trabalho, pela primeira vez duas novas estruturas cristalinas da ADK murina, sendo um complexo binário na presença do substrato ADO (mADK:ADO) e um complexo ternário na presença de ambos ADO e ADP (mADK:ADO:ADP). No complexo ternário, além dos substratos, identificamos íons regulatórios essenciais para sua atividade catalítica, e de forma inédita, um íon K^+ foi encontrado ligado entre regiões de alças adjacentes ao sítio de interação com o ATP. Neste sítio, o K^+ liga-se de forma hexacoordenada envolvendo às cadeias principal e lateral do Asp310 e a cadeia principal da Asn312, aminoácidos integrantes de um motivo que compõe um *anion hole* em quinases. Sua hexacoordenação completa-se através da interação com cadeias laterais da Ile330, Arg333 e Gly335 a partir da alça de extensão C-terminal da enzima. Ensaios de ressonância magnética nuclear 2D ^{15}N - 1H HSQC revelaram que a ligação de K^+ perturba o Asp310 e resíduos das hélices adjacentes ($\alpha 11$ e $\alpha 13$), envolvendo uma transição para uma estrutura cataliticamente produtiva. Consistente com os dados estruturais, mutantes D310P e D310A mostraram-se cataliticamente deficientes, com perda da capacidade de resposta ao K^+ . Espectros de Diferença de Transferência de Saturação (STD) em experimentos de titulação de ATP γ S forneceram evidências para a redução da afinidade do mutante D310P da mADK pelo ATP γ S. Além disso, demonstramos que aumento na concentração de K^+ modula a atividade *in vitro* da mADK (aumento de 2,5 vezes; K_d aparente = 10,4 mM). Mecanicamente, o K^+ aumenta a eficiência catalítica (K_{cat}), mas não afeta a afinidade da mADK para os substratos ADO e ATP. A depleção de K^+ intracelular inibe, enquanto o restabelecimento da concentração intracelular do K^+ recupera completamente a atividade celular de ADK. De maneira geral, nossos resultados contribuem para o entendimento da cinética da ADK e estabelecem base estrutural para a ativação alostérica da ADK por K^+ . Ainda, os resultados de experimentos funcionais em células apontam para o papel central da ADK como componente de um sistema de regulação do metabolismo de purina por variações da concentração intracelular de K^+ .

Palavras-chave: adenosina, adenosina quinase, *anion hole*, potássio e metabolismo de purinas.

ABSTRACT

Adenosine kinase (ADK -EC 2.7.1.20) is a phosphotransferase responsible for the catalytic transfer of γ -phosphate from ATP to adenosine (ADO). This reaction plays a key role in regulating cellular adenosine levels and thus interferes with various homeostatic and pathophysiological mechanisms (e.g. inflammation, ischemia, etc.). The catalytic reaction of ADK involves complex regulation by substrates and products, as well as by Mg^{2+} and inorganic phosphate. In this work, we report two new crystal structures of murine ADK, one binary complex in the presence of ADO (mADK: ADO) and one ternary complex in the presence of both ADO and ADP (mADK: ADO: ADP). In the ternary complex, besides the substrates, we identified essential regulatory ions for its catalytic activity, and for the first time, a K^+ ion was found bound between loop regions adjacent to the ATP interaction site. At this site, K^+ binds hexacoordinately in the main and side chains of the Asp310 and the Asn312 main chain, amino acids that form an anion hole in kinases. Its hexacoordination is complete through interaction with side chains of Ile330, Arg333 and Gly335 from the enzyme C-terminal extension loop. 2D ^{15}N - 1H HSQC nuclear magnetic resonance assays revealed that K^+ binding disturbs Asp310 and adjacent helix residues ($\alpha 11$ and $\alpha 13$), involving a transition to a catalytically productive structure. Consistent with the structural data, D310P and D310A mutants were catalytically deficient, with loss of K^+ responsiveness. Saturation Transfer Difference (STD) spectra in ATP γ S titration experiments provided evidence for the reduction of D310P mutant affinity for ATP γ S. In addition, we demonstrated that an increase in K^+ concentration modulates in vitro mADK activity (2.5-fold increase; apparent $K_d = 10.4$ mM). Mechanistically, K^+ increases catalytic efficiency (K_{cat}), but does not affect mADK affinity for ADO and ATP substrates. Intracellular depletion inhibits, while reestablishing of the intracellular K^+ completely recovers ADK cell activity. Overall, our results contribute to the understanding of ADK kinetics and establish a structural basis for allosteric activation of ADK by K^+ . Furthermore, the results of functional cell experiments suggest the central role of ADK as a component of a purine metabolism regulation system by intracellular K^+ concentration variations.

Keywords: adenosine, adenosine kinase, anion hole, potassium and purine metabolism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Espectros de RMN unidimensionais
2D	Espectros de RMN bidimensionais
3D	Espectros de RMN tridimensionais
ADK	Adenosina quinase
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina 5' - difosfato
ATP	Adenosina 5' - trifosfato
AMP	Adenosina 5' - monofosfato
CD	Dicroísmo circular
C-terminal	Carboxi-terminal
D ₂ O	Água deuterada
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
dNTP	Desoxinucleotídeo fosfatado
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons

LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
M9	Meio mínimo de cultura
NCBI	<i>Nacional Center of Biotechnology Information</i>
NOE	<i>Nuclear overhauser effect</i>
N-terminal	amino-terminal
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
pET	<i>Plasmid for expression. By T7 RNA polymerase</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Rh	Raio hidrodinâmico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	Raiz quadrada do quadrado do desvio padrão médio
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida
STD	Diferença de Transferência de Saturação (STD)
T _m	Temperatura de transição/ <i>melting temperature</i>
Trosy	<i>Transverse relaxation-optimized spectroscopy</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1.1 Adenosina	14
1.2 Enzimas envolvidas na metabolização e produção de ADO	16
1.3 Adenosina quinase – ADK	18
1.4 Aspectos da enzimologia da ADK	19
1.4.1 Especificidade do substrato	20
1.4.2 Requerimento de cátions bivalentes	20
1.4.3 Regulação por fosfato inorgânico	21
1.5 Estrutura da proteína	21
1.6 Estrutura cristalina	24
1.7 Regiões regulatórias da ADK e da família das RK	25
1.8 Regulação de ADK como alvo terapêutico	27
2. OBJETIVOS	29
3. METODOLOGIA	30
3.1 Produção das proteínas	30
3.1.1 Amplificação e clonagem da mADK e sua variante mADK Δ 19	30
3.1.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	32
3.1.3 Mutagênese sítio dirigida	34
3.1.4 Expressão e purificação dos mutantes D310A e D310P	35
3.2 Estudos estruturais	36
3.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS	36
3.2.2 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular – CD	36
3.2.3 Estabilidade térmica monitorada por dicroísmo circular	37
3.2.4 Ensaios de Cristalização	37
3.2.5 Refinamento das condições iniciais de cristalização	39
3.2.6 Coleta de dados de difração e processamento	39
3.2.7 Resolução das estruturas e refinamento	39
3.3 Caracterização Bioquímico-Cinética	40
3.3.1 Ensaio de atividade enzimática	40
3.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos	42

3.3.3 Ensaio de ativação por potássio	42
3.4 Elucidação estrutural por RMN	43
3.4.1 Marcação seletiva das proteínas com ^{15}N , ^{13}C e ^2H	43
3.4.2 Experimentos de RMN multidimensional.....	44
3.4.3 Experimentos de interação da mADK e seu mutante D310P com o substrato ATP γ S via RMN-STD	45
4. RESULTADOS	48
4.1 Artigo.....	48
5. RESULTADOS COMPLEMENTARES	91
5.1 Clonagem, expressão e purificação da mADK e mADK Δ 19	91
5.2 Mutagênese sítio dirigida da mADK.....	94
5.3 Caracterização estrutural das proteínas recombinantes por Dicroísmo circular (CD) e Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	96
5.4 Caracterização estrutural dos mutantes por Dicroísmo circular (CD) e Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	98
5.5 Cristalização da mADK na presença de ADO, coleta de dados e processamento	100
5.6 Cristalização da mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP, coleta de dados.....	103
e processamento	103
5.7 Determinação das estruturas dos complexos.....	106
5.8 Estrutura global da ADK murina.....	107
6. DISCUSSÃO.....	109
7. CONCLUSÃO	112
8. REFERÊNCIAS.....	113
9. ANEXOS	123
ANEXO 1. Autorização da Springer Nature para reprodução integral do artigo referente as atividades desenvolvidas durante o doutorado.....	123
ANEXO 2 - Reporte de validação da Estrutura de raio-x depositada no PDB: código 5KB5	124
ANEXO 3- Reporte de validação da Estrutura de raio-x depositada no PDB: código 5KB6	125
ANEXO 4 - Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Uso de Organismos geneticamente modificados.....	126

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adenosina

Os sistemas vivos complexos contam com mecanismos de auto regulação para ajustar a demanda metabólica disponível nas fontes de energia. A adenosina (ADO), um nucleosídeo purínico, é considerada um agente crítico para a manutenção do equilíbrio energético celular. De fato, já foi denominada de “sinal da vida ou metabólito retaliatório” (1), pois seus níveis aumentam rapidamente em situações de depleção energética (ATP) e desencadeiam mecanismos compensatórios que resultam ao mesmo tempo em inibição do consumo energético e favorecimento dos meios para a produção de energia. Assim, a ADO controla importantes funções fisiológicas que incluem: mecanismos para aumentar a oferta de oxigênio por meio da regulação do fluxo sanguíneo, regulação da temperatura corporal, regulação da angiogênese e também respostas imunes (2). Ainda neste contexto, é importante destacar que a ADO é um substrato crítico para a síntese de agentes redutores como NAD e FAD, pervasivos nas reações de oxirredução do metabolismo energético.

A maior parte das funções fisiológicas controladas por ADO são mediadas por quatro tipos de receptores acoplados a proteínas G (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) (3-5), embora também exerça funções independentes dos receptores (Figura 1).

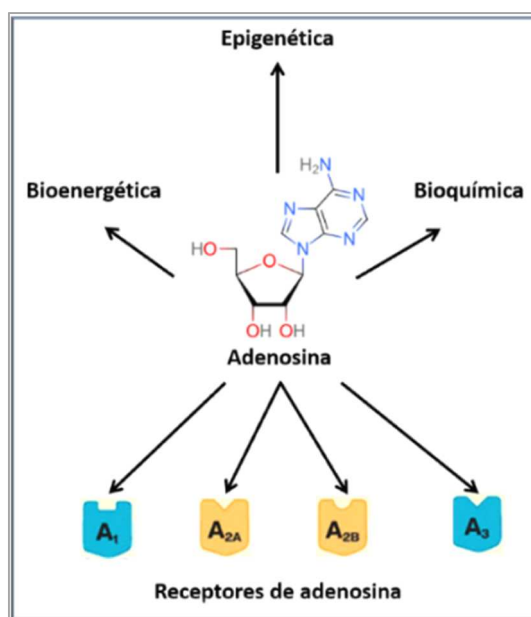


Figura 1. Adenosina age como regulador homeostático de modo independente ou dependente de múltiplos receptores de adenosina (Modificado de Boison, 2013).

Sob condições de stress, os níveis de ADO são rapidamente aumentados, desencadeando efeitos protetores locais (6, 7). Mais especificamente, ADO foi relacionada a proteção em lesões decorrentes de isquemia-reperfusão no cérebro (8), coração (9), medula espinhal (10) e rim (11). Esses achados corroboram com relação ao mecanismo local de proteção desencadeado pelos altos níveis de ADO, o qual aumentou a oferta de energia e ao mesmo tempo, sinalizou para a diminuição da demanda energética no mesmo tecido. O aumento de ADO foi relacionado a um desbalanço entre a demanda de O₂ e a demanda, resultando em uma desproporção entre a formação e consumo de ATP. Consequentemente, aumento do substrato AMP e elevado nível de atividade de enzimas formadoras de ADO, que serão melhores discutidas nas sessões abaixo. Esses estudos também sugerem que essa via pode não ser a única responsável e suficiente por coordenar os efeitos de proteção miocárdica. Atribuiu-se adicionalmente, um importante papel à enzima adenosina quinase (ADK; EC 2.7.1.20) no acúmulo e liberação de ADO durante a proteção miocárdica. A inibição dessa enzima durante a hipóxia (12), favoreceu a liberação de ADO, juntamente a ressíntese via AMP citosólicos. Adicionalmente ao seu importante papel de protetor tecidual, ADO também exerce efeitos diversos em funções neuronais, com impacto na regulação do sistema nervoso e, por conseguinte, agonistas de receptores de adenosina têm demonstrado efeitos antinociceptivos potentes em diversos modelos pré-clínicos de dor crônica. (13). A desregulação de níveis de ADO, implicou em epileptogênese e terapias celulares tem sido sugerida para aumentar localmente níveis de ADO e consequentemente diminuir ou até evitar convulsões. ADO foi reportada como importante no controle das funções cerebrais em condições fisiopatológicas, via neuromodulação mediada pela ativação dos receptores A₁, A₂, A_{2B} e A₃ com menor frequência (14). Além disso, anormalidades em sua regulação também têm sido descritas em distúrbios psiquiátricos e neurodegenerativos tais como, esquizofrenia, doença de Alzheimer, Doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (15-18). Mais recentemente, estudos empregam a ADO como um potente anticonvulsivante endógeno, que age por meio de uma combinação de mecanismos dependentes e independentes dos receptores, afetando diretamente o desencadeamento de crises convulsivas, bem como o desenvolvimento da epilepsia e sua progressão (19-21). Os exemplos de problemas neurológicos citados acima, indicam que concentrações de ADO necessitam estar sob um fino controle, e qualquer aumento ou diminuição da ADO ambiente, pode acarretar patologias via desbalanço de efeitos secundários de forma independente ou mediados pelos seus receptores específicos.

1.2 Enzimas envolvidas na metabolização e produção de ADO

As concentrações intra e extracelular de ADO coexistem em um estado de equilíbrio dinâmico influenciado pela produção a partir de ATP, ADP e AMP e pela sua conversão para AMP em ambos os ambientes por um processo conhecido como “via de salvamento de purinas”, que é distinto da síntese de novo de purinas (Figura 2). Transportadores de ADO (transportadores de nucleosídeos – NT) localizados na membrana celular são efetores do equilíbrio entre os dois ambientes (22), onde as concentrações intra e extracelular de ADO são relativamente baixas em condições fisiológicas, mas podem aumentar de forma expressiva em situações de estresse celular. Sob condições normais, a concentração citosólica de ADO foi estimada entre 0,01 a 0,1 μM em coração de porquinho da índia (23), por outro lado, em eventos de hipóxia a concentração intersticial de ADO foi demonstrada estar acima de 30 μM no miocárdio (24), 30 μM no cérebro (25, 26) e 100 μM na medula espinhal (26). Phillis e colaboradores estimaram a concentração de 30-50 nM em córtex cerebral de rato sobre condições normais (8) e concentrações de ADO extracelular maiores que 20-40 μM foram obtidas por microdiálise, após indução de isquemia (27-29).

Na “via de salvamento” a formação de ADO se dá por meio de três rotas possíveis. A rota mais importante é via catálise através da enzima 5'-nucleotidase (5'NT; EC 3.1.3.5), responsável pela hidrólise do AMP em ADO e fosfato inorgânico. Alguns estudos mostraram que essa enzima é responsável por mais de 70% da produção de ADO em corações de mamíferos (30). A enzima Ecto-5'-nucleotidase (CD73) por sua vez, leva ao acúmulo de ADO extracelular, que pode ativar os receptores específicos de ADO (31). E por fim, ADO também pode ser formada através do metabolismo de aminoácidos via hidrólise da SAH (S-adenosilhomocisteína) via SAH hidrolase (EC 3.3.1.1) (32).

Quanto a metabolização, no ambiente intracelular a ADO é rápida e eficientemente fosforilada em AMP pela ADK, o que impede a extrusão celular do núcleo purínico e força seu fluxo em direção à síntese de ATP. Alternativamente, no ambiente intracelular e extracelular, a ADO pode ser desaminada em inosina pela Adenosina deaminase (ADA; EC 3.5.4.4), enzima de baixa afinidade, a qual assume o papel de depuração em altos níveis de ADO, seguindo uma rota de degradação (33). O valor de K_m para ADO da enzima ADA está na faixa de 25 a 150 μM (dependendo da isoforma)(34, 35), muito acima quando comparado ao da ADK, estimado na faixa de 1 μM (36-38) . Essa característica faz da ADK a principal enzima reguladora de níveis de ADO, indicando que ADK é ativada em concentrações muito menores comparadas a ADA.

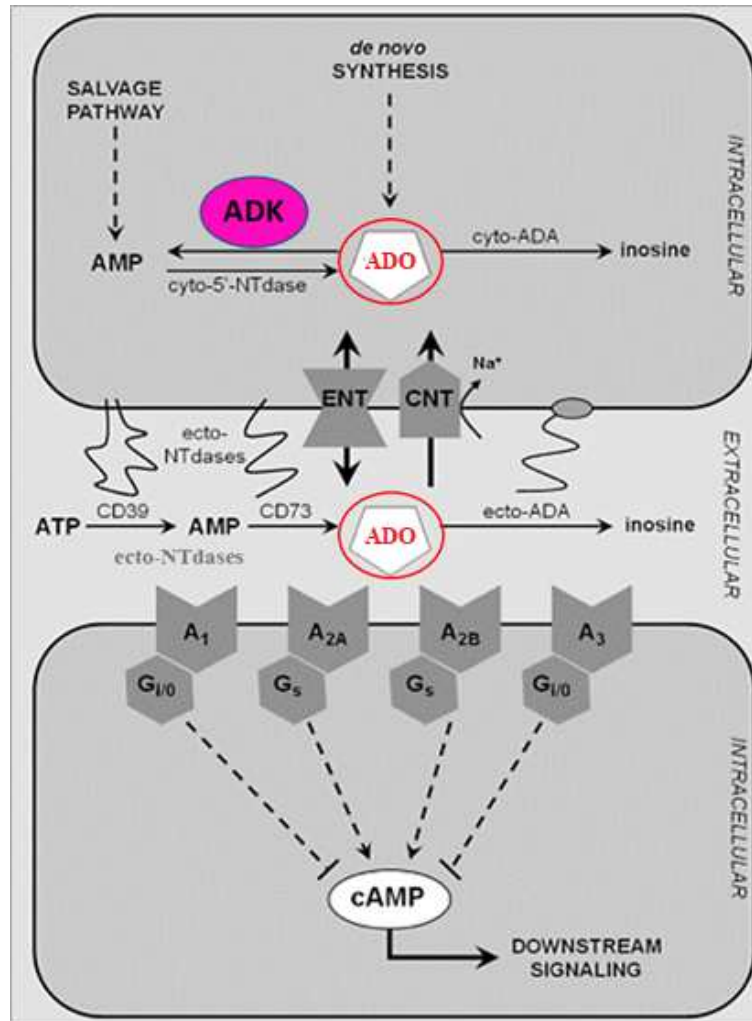


Figura 2. Metabolismo, transporte e sinalização de adenosina (ADO). ADO intracelular pode ser sintetizada de novo ou via salvamento de purinas, incluindo desfosforilação do AMP pela citoplasmáticas 5-nucleotídes (cyto-5'-NTdase). Duas famílias de transportadores de nucleosídeos mediam a troca de ADO através da membrana plasmática: o transportador de nucleosídeo equilibrativo (ENT), que permite o fluxo bidirecional por difusão, enquanto o transportador de nucleosídeo concentrativo (CNT) usa o acoplamento Na^+ para trazer a ADO para a célula contra o gradiente de concentração. A ADO extracelular é formada principalmente pela degradação do ATP por ectonucleotídes (ecto-NTdases) de superfície como CD39 e CD73. Os níveis de ADO extracelular são ainda regulados pela atividade da ectoadenosina deaminase (ecto-ADA), que converte ADO em inosina, ou pela captação celular, seguida pela degradação em inosina pela ADA citoplasmática (cyto-ADA) ou fosforilação em AMP pela adenosina quinase (ADK). A atividade biológica da ADO extracelular nas células alvo é mediada por quatro receptores de membrana (A_1 , $\text{A}_{2\text{A}}$, $\text{A}_{2\text{B}}$ e A_3) acoplados a proteínas G inibitórias ou estimuladoras (G_i/o ou G_s). As proteínas G são importantes transdutores de sinal que podem modular, por exemplo, os níveis de cAMP na célula, interferindo em muitas vias downstream e nos respectivos processos celulares.

Portanto, ADK e 5'-nucleotídeos são as enzimas críticas na determinação do nível intracelular e, por conseguinte extracelular de ADO, sendo alvos de mecanismos de regulação que permitem que células respondam rapidamente a alterações no seu status energético. Pequenas mudanças na atividade da ADK são rapidamente traduzidas em grandes variações na concentração de ADO intra e extracelular (40-42). Diante desse contexto, se a ADO não for constantemente removida pela ADK, o equilíbrio termodinâmico da reação de hidrólise da SAH hidrolase, que é reversível, favorece a formação da SAH, demonstrado ser um potente inibidor de reações de transmetilação (43). Portanto, sob condições fisiológicas, a atividade da ADK está constantemente relacionada ao controle da homeostase de ADO e ao estado energético da célula.

1.3 Adenosina quinase – ADK

ADK (adenosina 5'-fosfotransferase) é uma fosfotransferase que converte a ADO, em 5'- adenosina monofosfato (AMP) usando como principal fonte de fosfato o ATP (Figura 3A). O mecanismo reacional da ADK envolve a transferência do γ -fosfato do ATP para o grupo 5' hidroxí da ADO, formando AMP, com o Asp300 agindo como base catalítica na desprotonação desse grupo (Figura 3B). A transferência do fosfato do ATP ocorre segundo mecanismo do tipo S_N2 , conforme dados cristalográficos (44).

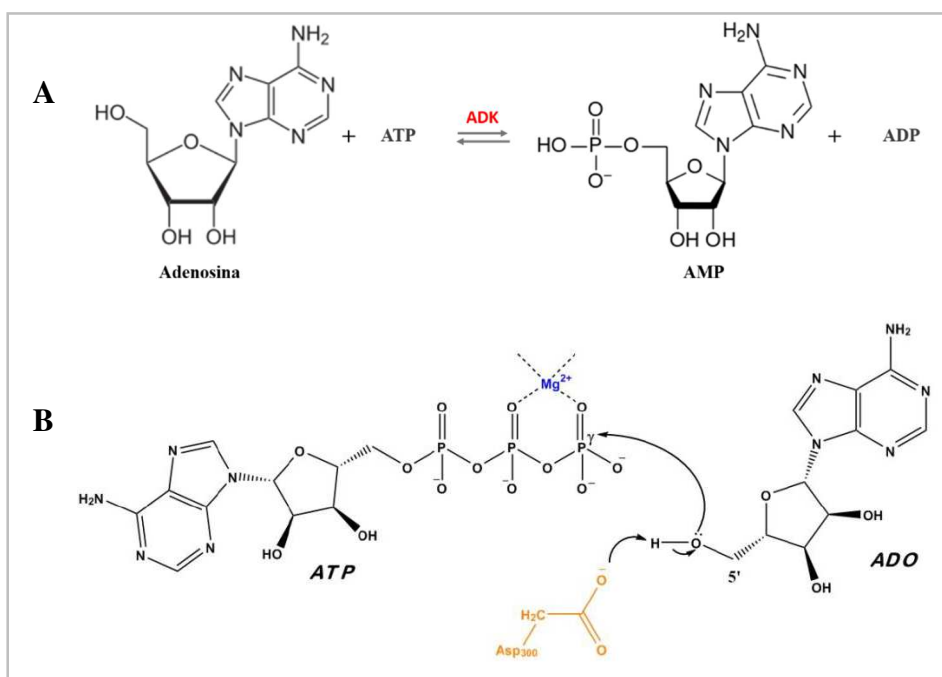


Figura 3. (A) Reação catalisada pela adenosina quinase. (B) Mecanismo reacional da ADK, ilustrando o ataque nucleofílico do grupo γ -fosfato do ATP pela ADO, levando a formação de

ADP e AMP. A presença do Mg^{2+} é fundamental para a atividade enzimática, uma vez que estabiliza as cargas negativas do grupamento fosfato, facilitando o ataque nucleofílico.

Trata-se da nucleosídeo quinase mais abundante em tecidos de mamíferos (45, 46) e, como discutido acima, possui papel fundamental na regulação de níveis intra e extracelulares de ADO. Após o seu primeiro isolamento em tecidos de leveduras e de mamíferos (47), muitos estudos vêm sendo realizados envolvendo diferentes aspectos desta importante enzima. Em particular, a sua inibição farmacológica, que resulta em aumento dos níveis teciduais de ADO, tem sido considerada para o tratamento de diversas condições clínicas como proteção tecidual em infarto do miocárdio, infarto cerebral, epilepsia e analgesia (48-51) e *interessantemente, para tratamento de esquizofrenia (52), diabetes (53) e linfoma de efusão primária (54).*

1.4 Aspectos da enzimologia da ADK

A ADK contém dois sítios catalíticos: um de alta afinidade o qual liga seletivamente ADO, e um de mais baixa afinidade, denominado de sítio de ligação ao nucleotídeo ou ATP (55). Uma característica única da reação catalítica da ADK é que o grupo fosforil acceptor (ADO) compartilha do mesmo motivo estrutural do grupo doador de fosfato (ATP). Como resultado, ADO pode ligar-se ao sítio do ATP, resultando na inibição enzimática conhecida como inibição pelo próprio substrato (56, 57). A inibição pelo substrato foi observada em amostras de ADK purificada de placenta humana, em concentrações de ADO maiores de 2,5 μM (57). O mesmo efeito de inibição foi encontrado em ADK purificada de eritrócitos (58) e fígado humano (59), com inibições na faixa de concentração significativamente mais baixas de ADO (0,5 μM). Considerando que concentrações fisiológicas intracelulares de ADO na maioria dos tecidos, estão na faixa de 25 a 300 nM (60), faixa de concentração mostrada não limitante para a atividade da ADK, a regulação pelo substrato em concentrações aumentadas de ADO pode representar um importante mecanismo fisiológico para potencializar as respostas de ADO endógena, como por exemplo em condições de injúria ou estresse agudo, que podem levar a concentrações micromolares de ADO (61, 62). A atividade da ADK também depende da concentração do seu produto fosforilado, AMP. Concentrações de AMP abaixo de 5 mM ativam a enzima, enquanto que concentrações acima de 5mM inibem a atividade da ADK (58). Sob condições fisiológicas, a concentração de AMP é de ~ 0,3 mM (63), concentração a qual espera-se que a ADK seja ativada por AMP, já que apenas excessivas concentrações de AMP inibem a enzima, como por exemplo sob condições

de estresse energético grave, uma resposta fisiológica significativa para aumentar a sinalização via ADO. A inibição da ADK em resposta a altas concentrações de AMP foi mostrada ser competitiva com relação à ADO e não competitiva em relação ao ATP (57). Com relação ao produto reacional ADP, estudos mostraram inibição competitiva em relação à ADO e ATP (64, 65). Estas características únicas da reação catalítica da ADK, geram dificuldades na interpretação de dados cinéticos e definição do seu mecanismo catalítico. Estudos cinéticos iniciais sugeriram mecanismo do tipo ping-pong com dois sítios (66), enquanto outros trabalhos têm proposto mecanismo do tipo Bi-Bi ordenado (67, 68).

1.4.1 Especificidade do substrato

Ainda relacionado a reação catalítica, a ADK apresenta alguma promiscuidade para interagir com ligantes no sítio do substrato acceptor do fosfato (ADO). Alterações no anel da ribose são toleráveis, embora a eficiência catalítica decresça de duas a cinco vezes (68). Um requisito estrutural importante, é que o nucleosídeo possua um grupo 2'- hidroxila na conformação trans. Nessa conformação, ambas 3' e 4'- hidroxilas podem estar em cis ou trans. Substituição ou adição de grupos funcionais na base puríca são aceitáveis, e compostos como a 8-aza-adenosina, apresentaram elevada eficiência de fosforilação em relação o substrato natural adenosina. Nucleosídeos e seus análogos, que são eficientemente fosforilados por ADK, também diferem da adenosina em substituições nas posições 2-, 6-, 7-, 8- e 9 (69, 70). Uma das consequências diretas para a ampla seletividade da ADK diante de nucleosídeos, é que a enzima pode ativar um grande número de antimetabólitos. Essa característica peculiar da ADK tem permitido o desenvolvimento de uma nova área promissora para a aplicação desses antimetabólitos em câncer e doenças virais (71) e quimioterapia antiparasitária (72).

1.4.2 Requerimento de cátions bivalentes

Em relação ao substrato doador de fosfato, ATP ou GTP são os principais nucleotídeos doadores de fosfato para ADK, embora outros nucleotídeos também possam participar da reação com menor eficiência (73, 74). No entanto, o principal substrato doador de fosfato, como para a maioria das quinases, é o complexo do nucleotídeo e um íon metálico

bivalente, no caso MgATP^{2-} . Na ausência de magnésio, a reação resulta em inatividade da ADK humana, enquanto na presença de magnésio, observa-se atividade ótima em valores de pH onde o ATP e o cátion bivalente existem preferencialmente na forma quelada. Curiosamente, a ADK também apresenta um efeito inibitório na presença de altas concentrações de magnésio livre (64, 73). Quando em complexo com o ATP, o íon magnésio se liga ao sítio ativo, induzindo o estado de transição reacional por aumentar a eletrofilicidade do átomo fósforo- γ , via interação com os átomos de oxigênio (74). Além disso, a presença do magnésio pode induzir orientação apropriada dos grupos funcionais dos substratos (75).

1.4.3 Regulação por fosfato inorgânico

Além de íons metálicos bivalentes, a atividade da ADK também é sensível a fosfato inorgânico, cujo mecanismo preciso de ação não é totalmente compreendido. Esta propriedade da enzima, que foi referida como dependência de fosfato, foi demonstrada pela primeira vez com a enzima de hamster chinês (76). Estudos estruturais indicam um fosfato ligado no sítio ativo em estruturas tridimensionais de riboquinases, enzima evolutivamente relacionada a ADK. O íon fosfato estabelece contato com os resíduos Asn187 e Glu190 e esses resíduos nessas posições são altamente conservados na família das riboquinases, e encontram-se no motivo de sequência, NXXE (73). Mutações pontuais destes resíduos (Glu242 e N239) foram avaliadas na ADK, e os mutantes mostraram-se completamente inativos, sugerindo a importância do motivo NXXE na ativação da ADK por fosfato.

1.5 Estrutura da proteína

A ADK cataliticamente ativa é expressa como um monômero (77, 78), e o uso de promotores alternativos ou *splicing* produzem diferentes isoformas em mamíferos (79-82). A ADK humana possui 4 isoformas, sendo que as isoformas 1 (P55263-1) e 2 (P55263-2) são enzimaticamente funcionais e sem grandes diferenças com relação as propriedades cinéticas (83). Por sua vez, as isoformas 3 (P55263-3) e 4 (P55263-4) diferem-se da canônica da pela ausência dos resíduos 186-242 e resíduos 1-17 e 48-65, respectivamente.

cDNAs de *Adk* murina, utilizados no presente estudo produzem duas proteínas de massas moleculares 40,1 e 38,4 kDa, denominadas de isoforma longa (ADK-*long*) e curta (ADK-*short*), respectivamente. Essas isoformas assemelham-se com as isoformas 1 e 2 da ADK humana, apresentando identidade de sequência de 91,44 % e 91,3%, respectivamente.

As isoformas murinas diferem-se apenas na região N-terminal. A isoforma short apresenta deleção de 16 aminoácidos na região N-terminal, e 4 aminoácidos distintos no início da sequência (Figura 4A). Um estudo inicial *in silico* realizado para este trabalho, mostrou que a região N-terminal diferenciada nas isoformas murinas, representa um segmento de estrutura secundária não definida (Figura 4B) e de predição intrinsicamente desordenada (Figura 4C). Curiosamente, a ADK de *Micobacterium tuberculosis* possui apenas a isoforma longa descrita (P9WID5-1) e representa a única ADK relatada como um dímero funcional (38). A susceptibilidade da ADK em sofrer modificações pós-traducionais foi avaliada por Sahin e colaboradores, que investigaram um painel de proteína quinases, e não foram encontradas alterações pós-tradução (e.g. fosforilação) na ADK de camundongos (84). Interações proteína-proteína foram identificadas em ADKs de alguns parasitas (77), sugerindo um mecanismo baseado em agregação e desagregação da enzima. Resta ainda uma investigação mais apurada sobre a existência de interações semelhantes e parceiros para as ADKs de mamíferos.

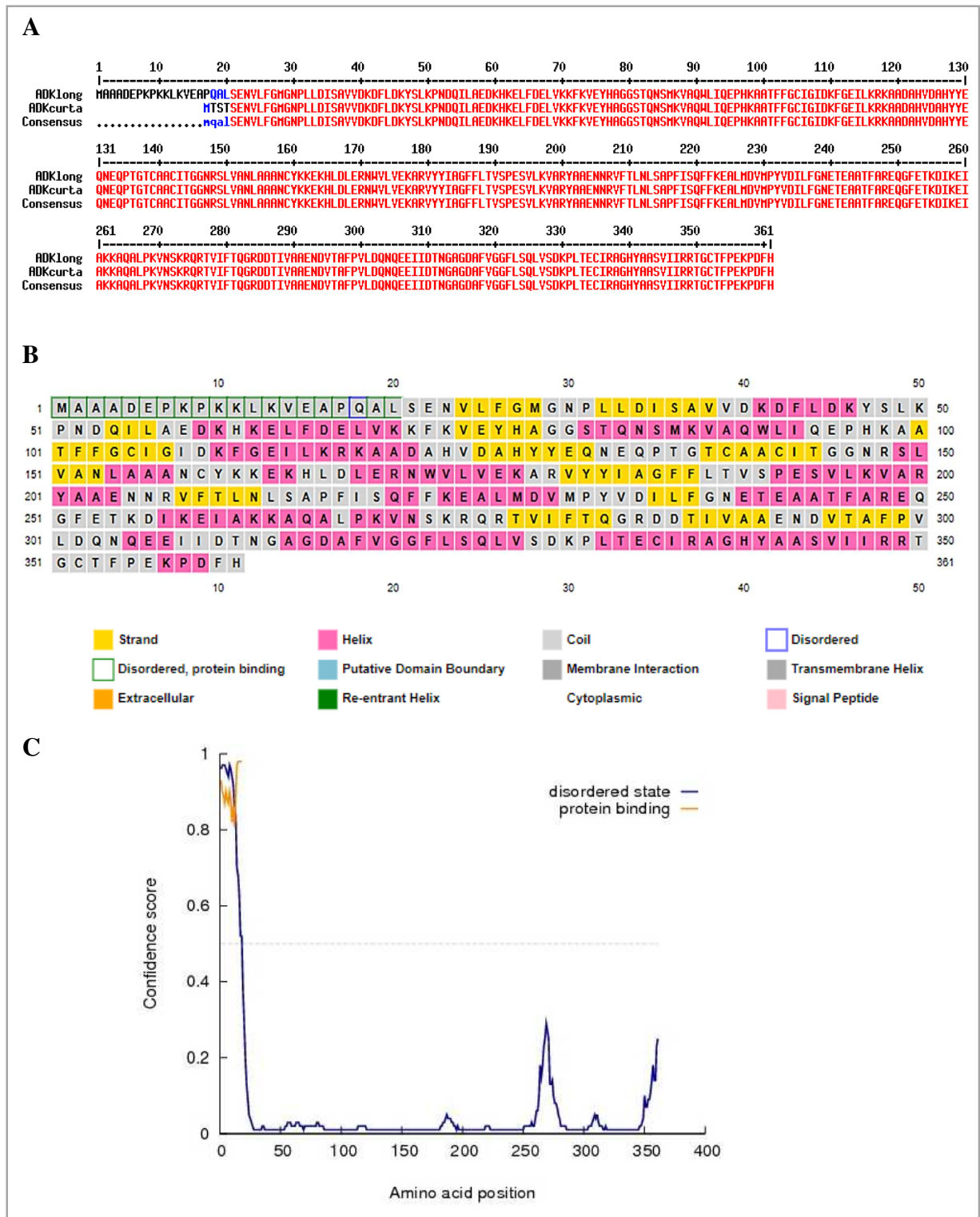


Figura 4. Alinhamento, predição de estrutura secundária e regiões desordenadas para as isoformas longa e curta da ADK murina. **(A)** Alinhamento das sequências codificantes para as isoformas longa (NP_598840.1) e curta (NP_001229970.1) da ADK murina. A figura destaca resíduos conservados em vermelho, resíduos diferentes e/ou ausentes em azul e preto, respectivamente. **(B)** Predição de estrutura secundária da isoforma longa de acordo com o servidor PSIPRED. A figura mostra a alta proporção de conteúdo de hélices- α e folhas- β na região que é conservada entre as isoformas da ADK e região N-terminal desordenada e sem identidade de estrutura secundária. A legenda abaixo da figura apresenta respectivamente cada elemento estrutural e sua cor representativa no diagrama. **(C)** Perfil de desordem intrínseca

calculado para a isoforma longa da ADK murina utilizando servidor DISOPRED. O Nível de precisão é estimado considerando a diferença entre os *outputs* (regiões ordenadas/desordenadas).

1.6 Estrutura cristalina

A estrutura cristalográfica da ADK foi inicialmente determinada para a enzima humana (PDB: 1BX4) (85), e subsequentemente a do protozoário *Toxoplasma gondii* (86, 87). Mais recentemente, estruturas tridimensionais de ADK de vários organismos eucarióticos e procarióticos foram resolvidas (88-95). A estrutura global da ADK humana possui dois domínios independentes, um domínio maior do tipo *sandwich* $\alpha/\beta/\alpha$ e um domínio menor do tipo α/β conectado por uma alça e constituindo-se em um *lid* na estrutura ativa (figura 5A). O domínio maior é composto por 9 folhas- β centrais flanqueadas por 10 hélices- α , abrigando os sítios catalíticos. O domínio menor, é formado por 5 folhas- β e 2 hélices- α , e duas moléculas de ADO ocupam os sítios catalíticos (Figura 5B). Os dois domínios apresentam-se conectados por um segmento de 4 resíduos, e o enovelamento do domínio menor, *lid*, sobre o domínio maior, forma a fenda catalítica que abriga os sítios de ligação (figura 5C).

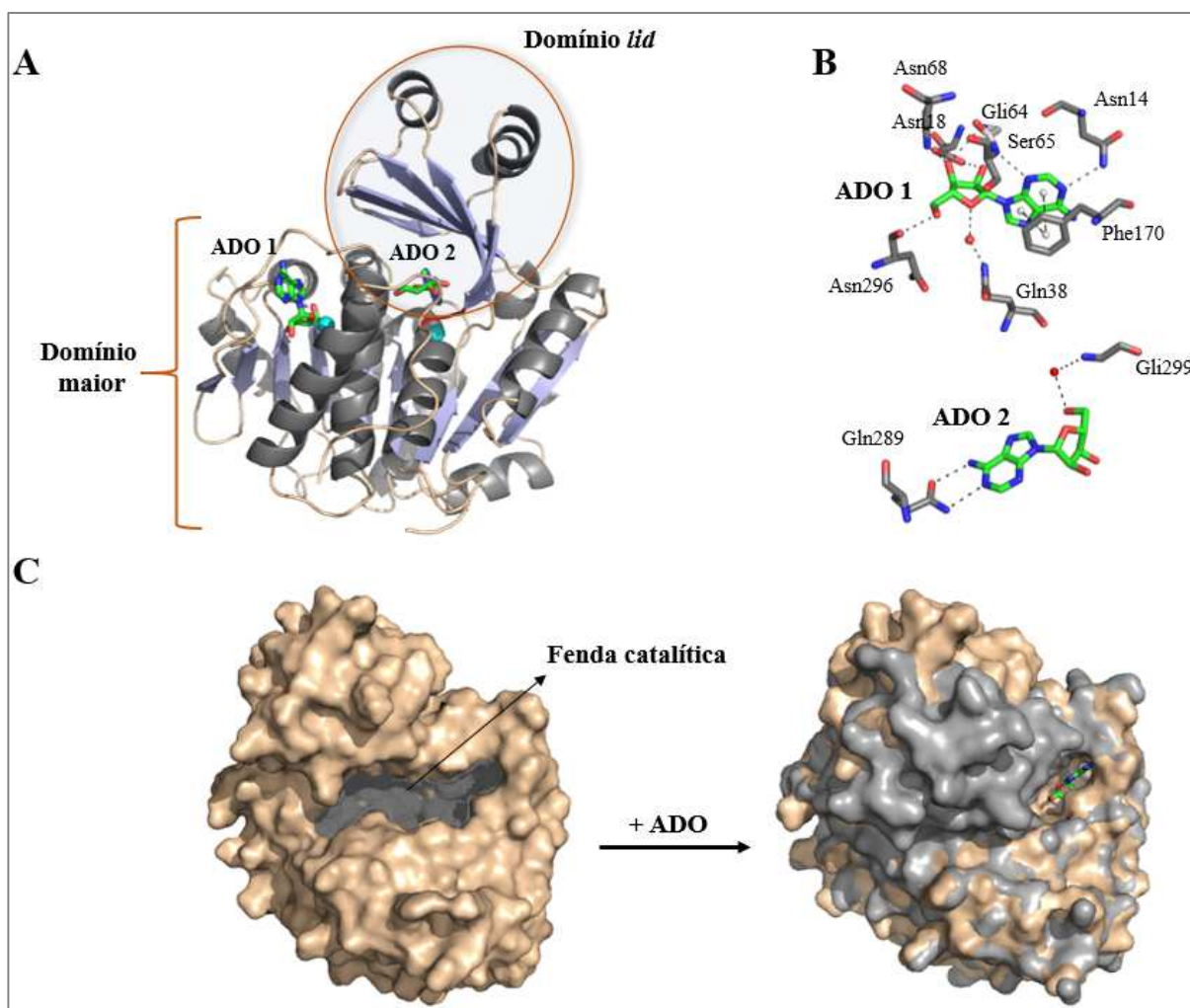


Figura 5. Estrutura cristalográfica do complexo binário da ADK humana com ADO. **(A)** Representação na forma de fitas da ADK humana na presença de 2 moléculas de ADO (PDB ID: 1BX4)(85). Na figura estão destacados os domínios maior e menor (*Lid* domain), 2 moléculas de adenosina representadas em bastões verdes com os átomos carbono, oxigênio e nitrogênio nas cores verde, vermelho e azul respectivamente. As esferas na cor ciano representam 2 cofatores Cl^- presentes na estrutura. **(B)** Resíduos envolvidos na interação com cada molécula de ADO no complexo binário. As esferas vermelhas representam moléculas de água. **(C)** Representação na forma de superfície da ADK, inicialmente na conformação aberta (colorida na cor salmão- PDB ID: 5KB6), destacando a localização da fenda catalítica na interface dos dois domínios. Após a ligação de ADO, ocorre uma mudança conformacional e o deslocamento do domínio *lid* sobre o domínio maior, protegendo a fenda catalítica do solvente e desencadeando a formação dos sítios catalíticos. O modelo de superfície na cor cinza, representa a estrutura do complexo binário da ADK humana (PDB ID: 1BX4)(16).

1.7 Regiões regulatórias da ADK e da família das RK

A ADK pertence à família das fosfofrutoquinases B (PfkB) ou também conhecida como família das Riboquinases (Família RK). Essa família de proteínas compartilha de uma série de características estruturais e elementos regulatórios únicos, os quais vem sendo alvo de estudos abrangendo: análises de estrutura primária e tridimensional, relações filogenéticas,

aspectos bioquímicos, exigências iônicas e correlação entre certos inibidores (96-98). Estas similaridades estruturais foram avaliadas e determinantes para sua classificação e determinação quanto a origem evolutiva das ADKs (99).

Os membros da família RK são identificados pela presença de dois motivos de sequência altamente conservadas (Figura 6). O primeiro motivo trata-se de duas glicinas consecutivas (GG), presentes em uma região rica em resíduos de glicina localizada na porção N-terminal. Os resíduos formam uma espécie de “dobradiça” entre os dois domínios (100, 101), e sofrem mudança conformacional durante a transição da conformação aberta para a conformação fechada da enzima. O segundo motivo estrutural é encontrado na região C-terminal, e está envolvido na ligação ao ATP e na formação de uma região que constitui um *anion hole* (87, 91, 96, 102). Essa região consiste tipicamente em esqueletos de amidas responsáveis pela estabilização do estado de transição e redução da energia de ativação necessária para a reação e catálise. Este motivo também contém um resíduo de ácido aspártico conservado que serve como base catalítica (85, 87, 100).

RBSK_ECOLI	41	GGK GANQ AVAAGR-----SGANIAFI ACTG	249	DTT AAGD TFNG ALI
RBSK_BACSU	38	GGK GANQ AVAAAR-----LGAQVFMVG KVG	236	DTT GAGD TFNAA FA
RBSK_YEAST	37	GGK GLNQ AAAI GK LKNPSSRYSVRM IGNVG	277	DTT GAGD TF LGG LV
RBSK_HUMAN	52	GGK GANQ CVQAAR-----LGAMTSMV CKVG	263	DTT GAGD SFVG ALA
ADK_MYCTU	47	GGV GGN MAFAIGV-----LGGEVALVGA AG	251	DPT GVGD AFRAG FL
ADK_MOUSE	79	GG SGQ NSMKVAQWLIQE-PHKAATFFGC IG	310	DTN GAGD AFVGG FL
ADK_HUMAN	80	GG SGQ NSIKVAQWMIQQ-PHKAATFFGC IG	311	DTN GAGD AFVGG FL
K1PF_BACSU	36	GGK G INVSRL LK R-----HHVASKALGF VG	243	NSV GAGD SVVAG FL
KHK_MOUSE	40	GGN G SN SCT VL SL -----LGARCAFMG SLA	252	DTL GAGD TFNAS VI
KHK_HUMAN	40	GGN G SN SCT VL SL -----LGAPCAFMG SMA	252	DTL GAGD TFNAS VI
KDGK_ECOLI	27	GGD GL NTSVYIARQVD-PAALT VH YVTAL G	258	DTT AAGD SFSAG YL
LACC_STRPN	36	GGK GLN VTRVLSE-----FGDSVLATGL VG	247	NPV GSGD STVAG IS
FRLD_ECOLI	24	GGN GVN VAVYCTR-----YGIQPGCITW VG	218	DTM GAGD SFIAG FL

Figura 6. Sequências e motivos conservados entre enzimas da família RK. Os resíduos de aminoácidos conservados estão em negrito e destacados com caixas cinza, estão os dois domínios presentes dentro da família. As enzimas estão abreviadas da seguinte forma: RBSK, riboquinase; ADK, adenosina quiinase; K1PF, 1-fosfofrutoquinase; KHK, cetohexoquinase; KDGK, 2-desidro-3-desoxigliconoquinase; LACC, tagatose-6-fosfato quinase; FRLD, fructoselisina quinase. Abreviaturas para as espécies: ECOLI, Escherichia coli; BACSU, Bacillus subtilis; YEAST, levedura; HUMAN, homo sapiens; MOUSE, mus musculus, MYCTU, Mycobacterium tuberculosis e STRPN, Streptococcus pneumoniae (78).

Enzimas que catalisam reações em várias etapas foram mostradas terem pelo menos uma ou múltiplas regiões de *anion hole*, as quais foram descritas estabilizarem diferentes estados de transição na reação (103).

1.8 Regulação de ADK como alvo terapêutico

O interesse na função e regulação da ADK é em grande parte devido ao fato dessa enzima representar um potencial alvo terapêutico para diversas doenças. Como discutido acima, a ADO exerce ampla gama de efeitos protetores e anti-inflamatórios em tecidos (104). Em contrapartida, a utilização de ADO exógena para fins farmacológicos foi mostrada ser limitada devido a restrições farmacocinéticas e farmacodinâmicas (105). Ainda neste contexto, o uso de agonistas seletivos para receptores de ADO também foi mostrado ser limitado, devido a efeitos adversos causados pela ativação dos receptores em tecidos não-alvo (14). Diante desse cenário, abordagens farmacológicas para regulação/inibição da ADK têm sido alvo de muitos estudos e vem sendo destacada como uma alternativa promissora para explorar a proteção tecidual mediada por ADO (106-108).

A classe de inibidores de ADK mais explorada até o momento consiste de análogos estruturais de ADO, tais como 5'-amino, 5'-deoxiadenosine (5'-NH₂dADO), 5-iodotubercidina e 5'-deoxiadenosina (5'-d-5IT), moléculas com IC₅₀ na faixa de nanomoles. Embora esses compostos tenham apresentado efeitos positivos em modelos animais de dor, epilepsia e isquemia (109-111), sua utilidade farmacológica se mostrou comprometida devido a baixa meia-vida no plasma, pobre biodisponibilidade, baixa seletividade e alto potencial na geração de metabolitos citosólicos capazes de exercerem efeitos inespecíficos indesejados (112, 113).

Outras aplicações terapêuticas baseadas em intervenções na ADK também estão sendo testadas, como por exemplo, estratégias de terapia gênica visando reduzir a expressão do gene *Adk* endógeno. Estudos aplicaram essa abordagem em modelos de convulsões e acidente vascular cerebral (52, 113), e juntos sugeriram que terapia genética alvejando a ADK restritamente a uma área específica do cérebro (hipocampo) e a um tipo de célula específica (astrócito), pode-se gerar efeitos terapêuticos potentes baseados no aumento das propriedades anticonvulsivas e neuroprotetoras da ADO. Entretanto, mais investigações precisam ser realizadas para confirmar se terapias genéticas anti-ADK são realmente eficazes em outros modelos clinicamente relevantes. Utilização de dieta cetogênica em modelos de

experimentação (114) e repressão transcricional (115) também tem sido metodologias alternativas empregadas para se modular a concentração de ADO, via ADK, entretanto precisam ser melhores exploradas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo foi planejado para determinar a estrutura cristalográfica e explorar potenciais mecanismos de regulação da ADK murina, com foco em potenciais alvos para uso terapêuticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1 Clonar, expressar e purificar a isoforma longa da ADK (mADK) e sua variante truncada mADK Δ 19.
- 2.1.2 Avaliar, via ensaios biofísicos de dicroísmo circular e DLS, a estabilidade e características estruturais das enzimas recombinantes.
- 2.1.2 Cristalizar a enzima na presença dos substratos e/ou cofatores.
- 2.1.3 Resolver as estruturas e obter modelos tridimensionais dos complexos.
- 2.1.4 Produzir mutantes da ADK via mutações pontuais sítio dirigidas e obter as proteínas recombinantes mutadas.
- 2.1.5 Avaliar estruturalmente a interação da mADK e proteína mutante com os substratos via RMN.
- 2.1.6 Padronizar ensaios bioquímicos como ferramenta para caracterização cinética, elucidação dos mecanismos de regulação e inibição da enzima.

3. METODOLOGIA

3.1 Produção das proteínas

3.1.1 Amplificação e clonagem da mADK e sua variante mADK Δ 19

A construção para a produção da isoforma longa da ADK murina (denominada de mADK, Met1 - His362) foi preparada pela amplificação da sequência nucleotídica a partir de biblioteca de cDNA de *Mus musculus*. Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores: oligo sense 5' -GGCCGGGGATCCATGGCAGCTGCGGACGAG-3' e oligo anti-sense 5' -GGCCGGAAGCTTTCAGTGGAAAGTCTGGCTTCTC-3', contendo endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O fragmento de DNA foi amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) contendo tampão reacional PCR Rxn invitrogen®; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP mix fermentas®; oligonucleotídeos específicos na concentração final de 0,2 mM; 100 ng de cDNA e 2,5U de enzima Taq DNA polimerase *high fidelity*. Em seguida, o fragmento amplificado e o vetor de expressão pET28a(+)-sumo foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI (NEB) e *Hind*III (NEB) em reações de 50 µl de volume final contendo, 30U de cada enzima de restrição, 1X tampão *CutSmart* (NEB) e 3 µg de DNA. A reação foi mantida a 37 °C por 1 hora. Os produtos digeridos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v), excisados e purificados do gel utilizando o kit QIAquick Gel Purification (QIAGEN) de acordo com o manual. Os fragmentos digeridos e purificados foram ligados através da reação de ligação contendo 1 µl da enzima T4 DNA ligase (NEB), 1X tampão da enzima T4 (NEB) em 10 µl de volume final de reação. As proporções entre inserto e vetor variaram na razão 3:1 e 5:1 (m/m), respectivamente. As reações de ligação foram conduzidas a 16°C, por 16 horas. Após a incubação, a reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias competentes da linhagem DH5 α (Davis, 1993) por meio de choque térmico (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989). As células foram semeadas em meio LB sólido contendo 50 µg/ml de canamicina e incubadas em uma estufa a 37 °C por 16 horas. As colônias selecionadas foram semeadas em meio LB, e uma alíquota de cada clone foi utilizada como molde em reação de PCR para seleção de clones positivos, utilizando pares de oligonucleotídeos específicos para o vetor de clonagem. Os clones positivos foram submetidos a extração de DNA plasmidial, e os DNAs recuperados foram quantificados a 260 nm e enviados para sequenciamento de DNA em equipamento ABI3500xl da Applied Biosystems. Para a

clonagem, optou-se pelo vetor pET28a(+)-sumo, cedido gentilmente pelo Dr. André Ambrósio do LNBio (Campinas). Este vetor consiste em uma versão modificada do vetor pET28a(+) contendo a inserção de um fragmento de DNA que codifica a proteína Smt3 de 11 kDa, Ubiquitina-like de *Saccharomyces cerevisiae* (UniProtKB/Swiss-prot: Q12306.1) clonada entre os sítios das endonucleases de restrição NheI e BamHI. A proteína Smt3, conhecida como SUMO, é um membro da família ubiquitin-like. Essa ferramenta permite a clonagem da proteína de interesse em fusão com a proteína SUMO na extremidade N-terminal da proteína. Após a expressão, o processo de clivagem da fusão é realizado através de uma reação de proteólise utilizando a SUMO-protease- Ulp1 (Ubiquitin-like-specific Protease 1 – EC 3.4.22.68) de *Saccharomyces cerevisiae* (UniProtKB/Swiss-Prot: Q02724.1). A clivagem é altamente específica e eficiente devido ao reconhecimento do motivo Gly-Gly na região C-terminal da SUMO (Mossesso e Lima, 2000). A figura 7 apresenta o mapa linear da construção resultante após a clonagem da mADK em vetor pET28a(+)-sumo.

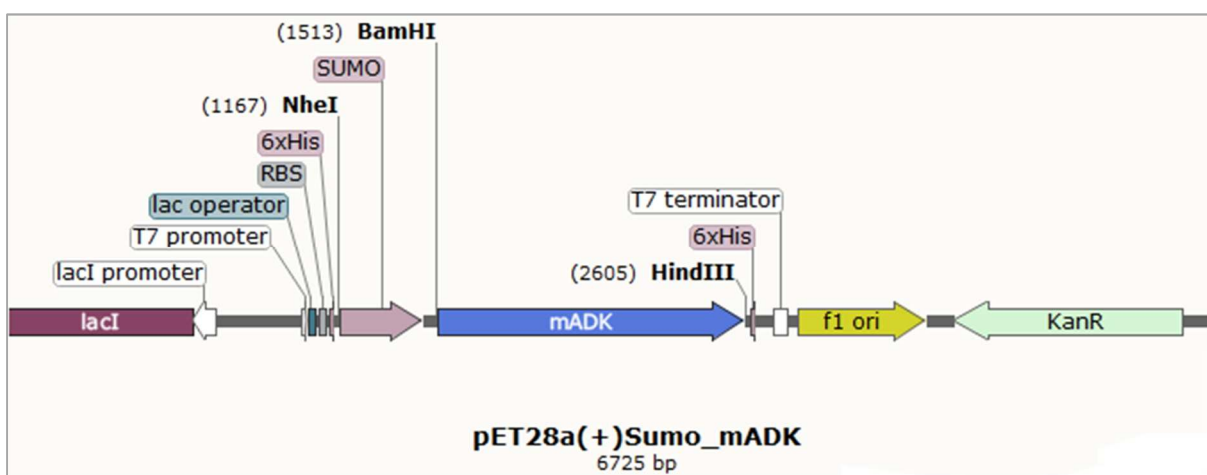


Figura 7. Representação esquemática da construção resultante após a clonagem da isoforma longa da ADK murina (mADK) em vetor pET28a(+)-sumo. O mapa foi desenhado no programa SnapGene (da GSL Biotech; disponível em snapgene.com).

Após a obtenção da construção contendo a enzima ADK murina inteira (mADK, isoforma longa), seguiu-se para a clonagem de uma variante da enzima truncada no aminoácido 19 (denominada de variante mADK Δ 19, Leu20-His362). A estratégia de deleção dos 19 aminoácidos iniciais da região N-terminal, foi fundamentada no estudo *in silico* preliminar (apresentado na figura 4), que predisse essa região como intrinsecamente desordenada e sem estrutura secundária definida. Diante disso, desenhou-se um oligonucleotídeo sense (5'-ATTATTATTGGATCCCTGAGTGAAAATGTGCTAT-3') para iniciar a amplificação do fragmento a partir do resíduo de número 20. O mesmo oligonucleotídeo antisense usado

anteriormente na clonagem da isoforma longa da enzima foi utilizado para compor a amplificação por reação em cadeia de polimerase, PCR. Utilizou-se como DNA molde a construção da mADK (pET28a(+)_{sumo}_mADK) e o fragmento de DNA obtido foi clonado da em vetor pET28a(+)_{sumo} utilizando o mesma metodologia aplicada na clonagem da isoforma longa. A figura 8 apresenta o mapa linear da construção final referente a variante truncada mADK Δ 19 em vetor pET28a(+)_{sumo}.

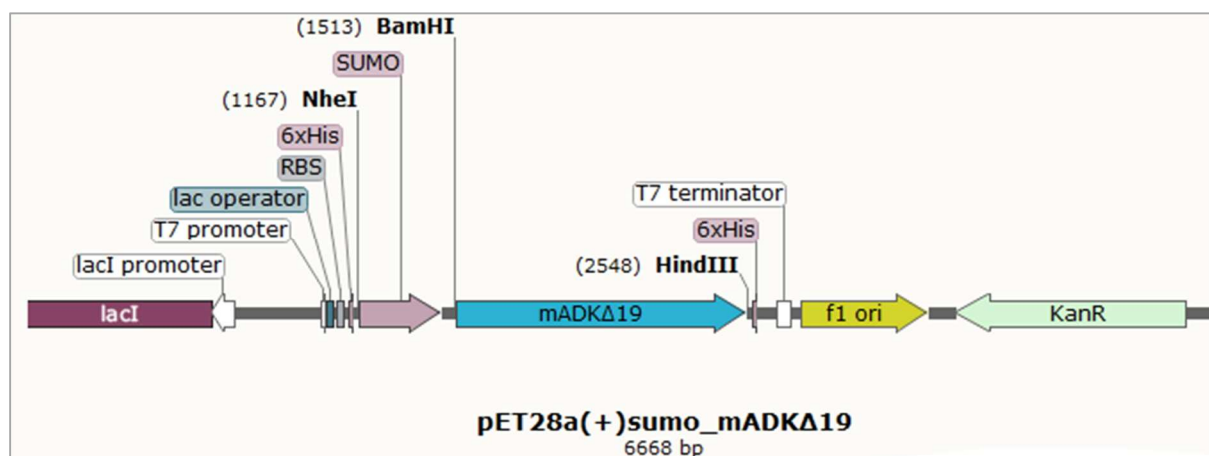


Figura 8. Representação esquemática da construção final da enzima truncada, mADK Δ 19 em vetor pET28a(+)_{sumo}. O mapa foi desenhado no programa SnapGene (da GSL Biotech; disponível em snapgene.com).

O plasmídeo para a expressão heteróloga da SUMO-protease Ulp1 também foi cedido pelo Dr. André Ambrósio, de forma a ser produzida para a realização dos experimentos deste trabalho.

3.1.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

3.1.2.1 Teste de expressão em linhagem de *E.coli* BL21(DE3)

Inicialmente, realizou-se um teste de expressão das proteínas clonadas como descrito inicialmente para a ADK humana. (16). Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar cepas de *E. coli* da linhagem BL21(DE3) (Novagen) para a expressão das proteínas de interesse. O teste foi conduzido, variando-se a concentração do agente indutor, temperatura e tempo de expressão, objetivando melhorar o rendimento e a solubilidade das proteínas. Preparou-se um pré-inóculo em meio LB suplementado com 50 μ g/ml de canamicina e a cultura foi mantida a 37°C, durante 16 horas sob agitação constante de 200 rpm. Essa cultura inicial, foi então diluída em meio LB (proporção 1:100), suplementada com o antibiótico de

seleção canamicina e mantida a 37 °C sob agitação até atingir a densidade ótica entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. Após atingida a densidade celular, volumes de 25 ml de cultura foram submetidos as diferentes condições para a expressão das proteínas: 0.2; 0.5 e 1mM do indutor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo, temperaturas de 18, 22, e 37 °C pelo período de 4 a 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 4 °C, 6000xg, ressuspendidas em 0,5 ml de tampão para lise (20 mM Fosfato de Sódio pH7.8 e 300 mM NaCl), contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e submetidas a sonicação a 5 W de potência por 6 ciclos de 10 s cada e intervalos de 60 s. Os precipitados e sobrenadantes foram obtidos por centrifugação a 10000g e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 12 % para verificar o rendimento e a solubilidade das proteínas.

3.1.2.2 Expressão em larga escala

Uma única colônia de células BL21 (DE3) transformada com cada plasmídeo, foi utilizada para inocular 10 ml de meio LB suplementado com 50 μ g/ml de canamicina e a cultura mantida a 37 °C durante 16 horas sob agitação constante de 200 rpm. As culturas foram diluídas na proporção 1:100 em meio de cultura LB, acrescido de 50 μ g/ml canamicina e incubadas a 37 °C sob agitação até atingir uma densidade ótica entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. A expressão das proteínas foi induzida com 0.5 mM de IPTG pelo período de 16 h a 22 °C. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 4 °C e 6000xg e armazenadas a -20 °C.

3.1.2.3 Purificação por cromatografia de afinidade

A primeira etapa de purificação foi cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado (IMAC) pré-empacotada (HisTrap® Chelatinhg HP -GE), acoplada ao sistema AKTA-FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography – GE). As células foram submetidas a lise celular em tampão A (50 mM fosfato de sódio pH 7,8 e 300 mM NaCl), através de sonicação a 5 W de potência com ciclos de 10 segundos e intervalos de 60 segundos, em equipamento sonicador Vibra Cell® Sonics. O sobrenadante foi separado por centrifugação durante 1 hora, 20000g a 4°C, e aplicado na coluna já previamente equilibrada com tampão A. As impurezas foram separadas através de duas etapas de lavagem, inicialmente com tampão A

(aproximadamente 10 volumes de coluna) e sem seguida com tampão B (50 mM fosfato de sódio pH 7,8; 300 mM NaCl e 10% glicerol)(10 volumes de coluna). As proteínas foram obtidas após aplicação de um gradiente linear de 0 a 500 mM imidazol em tampão B. As frações coletadas foram analisadas em gel desnaturante SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970) e corado com azul de Coomassie. Frações contendo as proteínas de interesse foram unidas e submetidas a clivagem proteolítica da cauda de fusão de 6-histidinas na presença da protease Ulp1, durante uma etapa de diálise em tampão B. Adicionou-se a protease Ulp1 de acordo com a relação 1:50 (1mg de Ulp1:50 mg de proteína) e incubou-se a por 16h a 4°C, sob agitação. Após a clivagem, o material dialisado foi novamente submetido a cromatografia afinidade em resina de níquel previamente equilibrada com tampão B. As proteínas foram obtidas na fração não adsorvida na coluna (*flow through*), enquanto que a cauda de fusão 6-His_sumo e a protease Ulp1 recombinante, mantiveram-se retidas na coluna e foram isoladas após aplicação de 500 mM de imidazol. As proteínas clivadas foram concentradas em concentradores do tipo Amicon® Ultra-15 de 10 kDa (Millipore) e submetidas a cromatografia por exclusão de tamanho.

3.1.2.4 Purificação por cromatografia de exclusão molecular

mADK e mADK Δ 19 recombinantes foram submetidas a purificação por cromatografia de exclusão de tamanho usando a coluna *Hiload Superdex 75 16/600* (GE Healthcare), em sistema de cromatografia *Äkta purifier* (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada previamente com tampão 20mM fosfato de sódio pH 7,8; 300mM NaCl, 10% glicerol, 5mM de imidazol e 1 mM DTT. O grau de pureza das amostras foi avaliado por gel SDS-PAGE 12% e as frações correspondentes ao pico de obtenção das proteínas foram combinadas, concentradas e quantificadas com base no coeficiente de extinção molar teórico por absorbância a 280 nm utilizando equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.1.3 Mutagênese sítio dirigida

Mutantes da mADK, D310P e D310A, foram obtidos a partir do plasmídeo pET28a(+)_sumo_mADK por mutagênese sítio-dirigida utilizando o kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies), conforme recomendações do fabricante. A tabela abaixo mostra os pares de oligonucleotídeos utilizados para gerar os mutantes D310A e D310P, respectivamente.

Tabela 2. Oligonucleotídeos desenhados para geração dos mutantes de mADK D310A e D310P.

Oligo	Sequência nucleotídica
mADK_D310A_F	5'AACCAGGAAGAGATCATTGCCACCAATGGAGCTGGAGAT 3'
mADK_D310A_R	5'ATCTCCAGCTCCATTGGTGGCAATGATCTCTTCCTGGTT 3'
mADK_D310P_F	5' CCAGGAAGAGATCATTCCTACCAATGGAGCTGGAG 3'
mADK_D310P_R	5' CTCCAGCTCCATTGGTAGGAATGATCTCTTCCTGG 3'.

Os oligos foram desenhados utilizando o programa QuikChange Primer Design (disponível em www.agilent.com/genomics/qcpd). As reações de mutagênese foram transformadas em células competentes de *E. coli* da linhagem XL10-Gold (da Agilent Technologies). As mutações foram confirmadas por sequenciamento de DNA utilizando oligos específicos para o vetor pET28a(+), *T7 promoter* (TAATACGACTCACTATAGGG) e *T7 terminator* (GCTAGTTATTGCTCAGCGG).

3.1.4 Expressão e purificação dos mutantes D310A e D310P

Após a confirmação por sequenciamento de DNA da presença das mutações pontuais, a produção das enzimas recombinantes mutadas procedeu-se utilizando protocolos previamente padronizados para a enzima selvagem. Brevemente, os plasmídeos contendo as mutações, foram transformados em *E. coli* B121(DE3) para os testes de expressão. As proteínas mutadas foram expressas empregando-se 0.5 mM do agente indutor IPTG, a 22°C e por 16h. As células foram ressuspensas em 0,5 ml de tampão A (50 mM fosfato de sódio pH 7,8 e 300 mM NaCl) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e sonicadas com 5 W de potência por 6 ciclos de 10s e intervalos de 60 s. Os precipitados e sobrenadantes foram obtidos por centrifugação a 10000g e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 12 % para se verificar o rendimento e a solubilidade das proteínas. As proteínas mutadas apresentaram elevado grau de expressão e solubilidade, viabilizando assim a expressão em larga escala e a obtenção das mesmas, empregando os protocolos de purificação utilizados para a enzima selvagem.

3.2 Estudos estruturais

3.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico – DLS

Medidas de espalhamento de luz dinâmico, DLS (*Dynamic light scattering*) foram realizados com objetivo de avaliar a monodispersidade populacional das proteínas em solução (homogeneidade estrutural). A medida de distribuição populacional tem-se demonstrado fator essencial para o sucesso em ensaios de cristalização e realização de análises biofísicas (116). Além da porcentagem da polidispersidade (%Pd), também se obtém o raio hidrodinâmico (Rh), parâmetro referente ao tamanho físico e forma da molécula nas condições tamponantes (difusão e viscosidade) em que a amostra se encontra. Para as medidas de DLS, as amostras foram previamente centrifugadas por 30 minutos a 4 °C, rotação de 20000g. Os experimentos foram realizados com as proteínas a 2 mg/ml, em tampão 20mM fosfato de sódio pH 7,8; 300mM NaCl, 10% glicerol, 5mM de imidazol e 1 mM DTT após a purificação por filtração em gel. As medidas foram realizadas em equipamento DynaPRO 180 (Protein Solutions), empregando 100 aquisições para cada amostra a temperatura de 18 °C, controlada por um sistema eletrônico do tipo Peltier. Os parâmetros hidrodinâmicos foram calculados utilizando o software DYNAMICS v.6.10.1.2).

3.2.2 Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular – CD

O conteúdo de estrutura secundária das proteínas recombinantes foi determinado por Espectropolarimetria de dicroísmo circular utilizando um espectropolarímetro Jasco J-180 (JASCO), equipado com módulo de temperatura Peltier. Coletou-se espectros de CD na região do ultravioleta distante (195 a 260 nm), em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico na presença de 10 µM de proteína em tampão 10 mM fosfato de sódio pH 7,8 e 20 mM de NaCl. Os espectros foram coletados com velocidade de varredura de 50 nm/min, largura da banda de 1 nm e tempo de resposta de 4 segundos. O espectro final foi obtido após a média de 20 acumulações, e corrigido pelo espectro referente ao tampão empregado na medida. Os dados foram convertidos para Elipticidade molar residual $[\Theta]$, através da equação $[\Theta] = (CD) / 10^* l * C * N$, onde CD é o sinal de elipticidade (em miligraus), l é o caminho ótico em centímetros

(cm), C é a concentração da proteína (em molar) e N é o número de resíduos (117). Os gráficos foram produzidos utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.1 para Windows (*GraphPad Software, La Jolla California USA*, www.graphpad.com).

3.2.3 Estabilidade térmica monitorada por dicroísmo circular

A estabilidade térmica das proteínas recombinantes foi avaliada pela técnica de dicroísmo circular, através do monitoramento de mudanças na elipticidade molar (Θ) em função do aumento da temperatura (ΔT , °C). A curva de desnaturação térmica foi obtida através da elipticidade molar observada a 222 nm no intervalo de temperatura de 20 a 90°C, empregando-se rampa de temperatura de 1°C/min. As proteínas foram preparadas a 10 μ M de concentração em tampão 10 mM fosfato de sódio pH 7,8 e 20 mM de NaCl. A transição do estado enovelado para desenovelado e foi avaliada pela conversão dos valores de elipticidade molar para α (fração enovelada- *fraction folded*) de acordo com a equação: $\alpha = (\Theta_t - \Theta_U) / (\Theta_F - \Theta_U)$, na qual Θ_t é a elipticidade molar medida a qualquer temperatura, Θ_F elipticidade molar na forma totalmente enovelada, Θ_U elipticidade molar na forma totalmente desenovelada (118). O grau de estabilidade foi avaliado pelo parâmetro T_m (*Melting Temperature*), temperatura quando $\alpha=0,5$, ou seja, a temperatura observada de transição entre os dois estados, utilizando modelo sigmoidal de Boltzmann.

3.2.4 Ensaios de Cristalização

As proteínas submetidas aos ensaios de cristalização foram isoladas por técnicas de purificação, gerando amostras homogêneas em solução e biologicamente ativas, pré-requisitos essenciais para sucesso na obtenção de cristais (119). Atualmente, sabe-se que todos os passos da cristalização de proteína estão interligados, e ocorrem em continua evolução. A nucleação e o crescimento procedem após a total supersaturação da solução (120), onde esse conjunto de fatores faz da tarefa de se cristalizar uma macromolécula biológica um enorme desafio. Variáveis como estabilidade, grau de pureza, pH, temperatura, agentes precipitantes, força iônica, entre outras representam a vasta gama de interferentes em um processo de cristalização. Diante disso, e após as etapas de isolamento das proteínas recombinantes, ensaios biofísicos e análises estruturais confirmaram as amostras como aptas para os ensaios de cristalografia. As

concentrações das proteínas foram calculadas por absorvância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar teórico ($\epsilon = 26,275 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) calculado pelo programa Protparam (disponível em *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal*) (121).

Os ensaios foram preparados em placas de 96 poços do tipo COC *Protein Crystallization Microplates* (Corning), roboticamente pipetadas pelo robô Honeybee disponível no Laboratório Robotizado de Cristalização de macromoléculas (ROBOLAB-LNBio-CNPq). Inicialmente foram utilizados kits comerciais e disponíveis no ROBOLAB, Crystal Screen I & II, Wizard I & II, JCSG+, Precipitant Synergy™, PACT and SaltRx. A técnica de cristalização escolhida foi a de difusão de vapor, que consiste no equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor em um sistema isolado. Essa técnica pode ser aplicada de diferentes formas: gota suspensa (*hanging drop*), gota sentada (*sitting drop*) e gota sanduiche (*sandwich drop*) (122). O método implementado foi o de gota sentada como mostrado na figura 9.

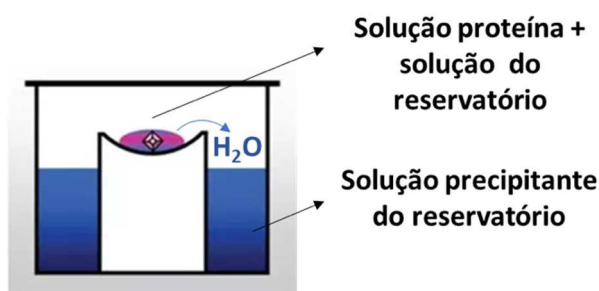


Figura 9 – Representação esquemática do método de gota sentada, em placa *Cryschem*, utilizado nos experimentos de cristalização.

Empregou-se gotas de 0,5 μl da solução de proteína e 0,5 μl de solução da condição. O sistema foi selado com a fita adesiva *Crystal clear* (Henkel Consumer Adhesives) e armazenado à temperatura de 18 °C dentro do sistema automatizado *Rock Imager 1000* (Formulatrix) para a visualização e acompanhamento do crescimento dos cristais. Previamente a montagem das placas, mADK e mADK Δ 19, foram concentradas para aproximadamente 30 e 18mg/ml, respectivamente. As proteínas foram incubadas com 2.5 mM de cada substrato ADO, ADP e ATP. Complexos na presença de ambos os substratos, ADO e ADP ou ADO e ATP também foram preparados na presença de 2.5 mM de cada substrato. Os complexos permaneceram sob agitação branda por 16h a 4°C. No dia seguinte, centrifugou-se a 20000g por 30 minutos e as placas foram montadas.

3.2.5 Refinamento das condições iniciais de cristalização

Para melhorar os cristais obtidos nos testes iniciais, preparou-se o refinamento das condições de cristalização da mADK na presença de ADO e mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP. A partir dos componentes presentes na condição inicial, variou-se a concentração do agente precipitante, gradiente salino e solução tamponante de acordo com as condições iniciais obtidas. As condições utilizadas na otimização dos cristais foram escolhidas de modo que cada variável foi modificada por vez, enquanto os outros componentes da condição foram mantidos. Após a etapa de refinamento, novos cristais foram obtidos com morfologia e dimensões adequadas.

3.2.6 Coleta de dados de difração e processamento

Os cristais foram difratados na linha de luz MX2 disponível no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS-CNPEM, equipada com detector mosaico 225mm CCD (*Mar Research*) e uma mesa experimental da NatXray/Irelec. Para a coleta dos dados não foi necessário a utilização de solução crioprotetora, pois a própria solução da condição de cristalização apresentou tal propriedade. As coletas procederam-se em temperatura criogênica (100 K), com fluxo de nitrogênio gasoso para diminuir dano à radiação (Oxford Nitrogen Cryojet XL) (123). Os dados foram indexados e escalonados usando DENZO e SCALEPACK do pacote HKL2000 (124). Utilizou-se radiação de comprimento de onda 1,46 Å, e 360 imagens foram coletadas usando um ângulo de oscilação de 0,5° e um tempo de exposição de 20 s por imagem para o conjunto de dados referente ao cristal da mADK na presença de ADO e 30 s para o conjunto de dados referente ao cristal da mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP. A distância do detector foi definida para uma resolução máxima de 1,2 e 1,8 Å, respectivamente.

3.2.7 Resolução das estruturas e refinamento

As fases iniciais foram obtidas pelo método de substituição molecular (Rossmann, 1990) utilizando o programa MOLREP (125), que faz parte do programa CCP4 (*Collaborative Computational Project Number 4*).

Como modelo de busca utilizou-se a ADK humana (PDB ID: 1BX4), que apresenta uma identidade da estrutura primária de 90%. As estruturas foram refinadas com o programa REFMAC, e após cada ciclo de refinamento os modelos foram inspecionados manualmente pelo programa COOT (126). Moléculas de água foram adicionadas manualmente após refinamento das cadeias polipeptídicas. As estatísticas de coleta, processamento e refinamento estão resumidas nas tabelas 6 e 8. Os fatores de estrutura e as coordenadas atômicas foram depositados no *RCSB Protein Data Bank* (PDB) sob códigos de entrada 5KB5 e 5KB6.

3.3 Caracterização Bioquímico-Cinética

3.3.1 Ensaio de atividade enzimática

Para as medidas da atividade da mADK, empregou-se um ensaio acoplado de quinases que permite monitorar a atividade enzimática de enzimas quinases, acoplando à formação do ADP, a detecção de fluorescência via formação de resorufina. Trata-se de um ensaio robusto e sensível, onde a formação da resorufina é acompanhada via medidas de fluorescência sob excitação de 530-570 nm e emissão a 590 nm.

Este protocolo, adaptado do trabalho descrito por Charter e colaboradores (127), foi empregado na reação catalítica da mADK, onde seu produto ADP, entra como substrato principal do sistema acoplado de quinases (Figura 10). O sistema emprega as enzimas piruvato quinase (PK: 20 UI/mL), piruvato oxidase (POX: 1 UI/mL), peroxidase de raiz forte (HRP: 2 UI/mL), juntamente a fosfoenolpiruvato (PEP: 0,3 mM) como substrato de PK e os cofatores, pirofosfato de tiamina (TPP: 100 μ M), flavina adenina dinucleotídeo (FAD: 10 μ M) e 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina (Ampliflu red: 35 μ M), para converter o ADP em peróxido de hidrogênio, que por sua vez é oxidado para formar resorufina. A figura a seguir apresenta um esquema destacando: a reação catalítica da ADK, gerando o produto ADP, em seguida as etapas da reação de acoplamento fluorimétrica com as enzimas envolvidas, substratos e cofatores necessários para a geração de resorufina.

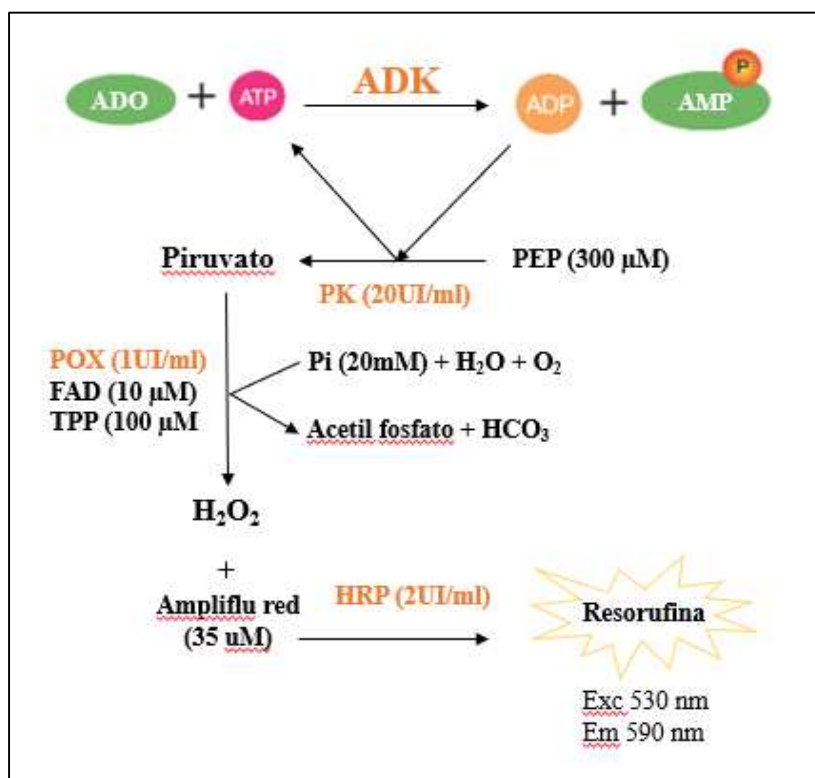


Figura 10. Ilustração do ensaio fluorimétrico acoplado de enzimas quinases. A primeira reação no topo da ilustração representa a reação catalítica da ADK, com seus substratos ADO e ATP e os produtos, AMP e o ADP. O produto ADP, entra como substrato para o ensaio acoplado de quinases, e uma cascata de reações geram no final o produto fluorescente, resorufina. As enzimas estão destacadas na cor laranja e suas abreviaturas representam respectivamente: PK, piruvato quinase; POX, piruvato oxidase e HRP, peroxidase de raiz-forte. Os outros componentes reacionais são: PEP, fosfoenolpiruvato; Pi, fosfato inorgânico; FAD, flavina adenina dinucleotídeo; TPP, tiamina pirofosfato e Ampliflu red (10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina). As concentrações utilizadas no ensaio estão anotadas entre parênteses ao lado de cada componente reacional.

O ensaio foi realizado em leitor de placas do tipo Multilabel EnVision® (Perkin Elmer) em placa de 96 poços, empregando-se a temperatura a 310K e medidas com duração de 30 a 60 minutos. Todos os experimentos foram normalizados através de curva padrão de ADP (RFU versus [ADP] µM), na presença de 0 de 1,0 µM ADP em tampão reacional 50 mM de Tris, pH 7,5, 20 mM KH₂PO₄, 10 mM MgSO₄ e 0,01%. Como controles reacionais, empregou-se: 1) reação na ausência da mADK, incluindo a presença do substrato e ATP para a correção do sinal basal oriundo da reação de acoplamento. 2) reação na ausência do substrato, incluindo a presença da mADK e ATP, para correção de possíveis sinais de autofosforilação ou atividade ATPásica.

3.3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos V_{max} , K_m e k_{cat}/K_m para a enzima mADK foram determinados na presença de 15 nM de enzima em tampão reacional 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM KH_2PO_4 , 10 mM $MgSO_4$ e 0,01% de Triton X-100. Para a determinação do K_m da ADO, empregou-se curva de 0 a 40 μM de ADO, mantendo fixa a concentração de ATP (20 μM). Para a determinação do K_m do ATP, empregou-se concentrações de 0 a 40 μM de ATP, mantendo a concentração de ADO fixa (10 μM).

Os ensaios para determinação dos parâmetros cinéticos dos mutantes D310A e D310P foram realizados da seguinte maneira. Para os ensaios de k_m da ADO, empregou-se 150 nM de cada mutante, ADO variando de 0 a 80 μM , e concentração fixa de ATP (50 μM). O K_m para o ATP foi obtido na presença de 150 nM de cada mutante, variando-se ATP de 0 a 320 μM mantendo a concentração fixa de ADO (50 μM).

3.3.3 Ensaio de ativação por potássio

O efeito de sais de cloreto monovalentes (KCl, NaCl e LiCl) na velocidade inicial da mADK e de seus mutantes foi acessado, empregando-se os protocolos e parâmetros cinéticos determinados no ensaio de atividade. Antes dos ensaios, a enzima selvagem e os mutantes, foram exaustivamente dialisados em tampão 30 mM Tris-HCl, pH 7,5. Após o passo de diálise, as enzimas foram centrifugadas a 20000g, por 30 minutos e submetidas a dosagem proteica a 280 nM. Os ensaios de ativação foram realizados nas seguintes condições: 15 nM de mADK na presença de 10 μM de ADO e 20 μM de ATP. Para os mutantes, 150 nM de enzima na presença de 50 μM de ADO e 50 μM de ATP. Todas as reações foram preparadas em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM $MgSO_4$, e 0,01% de Triton X-100, na presença de concentrações crescentes (0 a 160 mM) de cada sal, KCl, LiCl ou NaCl.

3.3.4 Ensaio de depleção de potássio celular.

Os ensaios celulares foram realizados com a linhagem celular HEK293 cultivadas em monocamadas semeadas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino e 100U/ml de penicilina e 100pg/ml de estreptomicina a 37 ° C. 1×10^7 células foram plaqueadas em placas de petri de 150 mm x 15mm e divididas em grupos denominados de: CT (controle, células

cultivadas em DMEM), 0, 2.5 e 5 mM K^+ . Para a depleção de K^+ celular, cada monocamada celular referente aos grupos teve seu meio de cultura descartado e foi submetida a uma etapa de lavagem em tampão 50 mM Hepes de sódio e 100 mM de NaCl 100 mM, pH 7,4). Logo em seguida, cada monocamada foi submetida a choque osmótico realizado por 10 minutos de incubação em meio hipotônico (DMEM/H₂O, 1:1), seguido de incubação durante 30 minutos em tampão isotônico sem K^+ (50mM Hepes de sódio, 140 mM NaCl, 1mM CaCl₂ e 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4). Após 30 minutos de incubação e depleção de potássio, o tampão foi removido e cada placa foi incubada no mesmo tampão (50mM Hepes de sódio, 140 mM NaCl, 1mM CaCl₂ e 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4) contendo 0, 2,5 e 5 mM de KCl. Uma das placas foi incubada com DMEM (CT- controle), que possui em sua formulação 5 mM KCl. Após o tratamento e restabelecimento de potássio, cada monocamada foi coletada e centrifugada a 500xg por 5 minutos. Uma alíquota celular referente a cada tratamento foi submetido a citometria de fluxo para contagem do número de células e normalização. Os lisados celulares foram submetidos a ensaio de atividade da ADK.

3.4 Elucidação estrutural por RMN

3.4.1 Marcação seletiva das proteínas com ^{15}N , ^{13}C e 2H

Utilizando método de expressão com marcação isotópica de proteínas, a mADK e o mutante D310P foram seletivamente expressos para incorporação dos isótopos ^{15}N , ^{13}C ou 2H (128). De acordo com o ensaio de RMN específico, realizou-se apenas a incorporação de ^{15}N ou a marcação com os 3 isótopos. Para a expressão, células de *E coli* da linhagem BL21(DE3) foram transformadas com os plasmídeos de interesse e após seleção em LB sólido contendo 50 µg/ml de canamicina, uma colônia foi inoculada em 5 ml de meio A (Tabela 3), suplementado com 50µg/ml de canamicina. Após 16 horas de crescimento a 37°C e agitação de 200 rpm, os 5 ml deste pré-inóculo foram usados para inocular 1L de meio A previamente suplementado com o antibiótico de seleção. A cultura foi mantida sob agitação até atingir a densidade óptica DO a 600nm de 0,8 a 1,0. Após atingida a densidade celular, a expressão foi induzida com 0.5 mM de IPTG, pelo período de 24h a 22°C. Para as marcações envolvendo o isótopo 2H , a H₂O utilizada no preparo das soluções estoque e meio A foi substituída por água deuterada (D₂O).

Tabela 3. Soluções estoque e preparo do Meio A para marcação isotópica de proteínas

Meio A (p/ 1L)	
100 ml	Meio M9 (10X)
10 ml	Solução de metais (100X)
20 ml	10% Glicose (^{13}C)
1ml	1M MgSO_4
1ml	Biotina (1mg/ml)
1ml	Tiamina (1mg/ml)
Meio M9 (10X), (1L)	
60g	Na_2HPO_4
30g	KH_2PO_4
5g	NaCl
5g	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
Solução de Metais (100X), (1L)	
0.83g	$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
0,084g	ZnCl_2
0,013g	$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,010g	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
0,010g	H_3BO_3
0,0016g	$\text{MnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
5g	EDTA*

As etapas de lise celular e purificação foram realizadas seguindo os protocolos padronizados para a produção da enzima selvagem e apresentados no início dessa sessão.

3.4.2 Experimentos de RMN multidimensional

Dados de espectroscopia de RMN uni, bi e tridimensional foram coletados a 298 K usando um Agilent DD2 500 MHz ou Inova 600 MHz espectrômetro equipado com uma sonda criogênica de ressonância tripla ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^1\text{H}$). Os dados foram coletados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear dentro do Laboratório Nacional de Biociências, LNBio. Todos os espectros de RMN foram processados utilizando o programa NMRpipe (129). Para a análise

dos espectros foi utilizado o programa NMRview 5.0 (130). As amostras foram preparadas em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7,5, 50 mM NaCl, 40 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT contendo D₂O a 5%/H₂O a 95% e a estabilidade das proteínas foram avaliadas após mantidas a 298K por uma semana. Visando o assinalamento sequencial dos núcleos, os seguintes experimentos de 3D de tripla ressonância foram adquiridos: HNCACB, HN(COCA)CB, HN(CO)CA, HNCA, HNCO e HN(CA)CO. Para tal, utilizou-se amostras no volume de 330 µl de proteína triplamente marcada, utilizando tubos do tipo *Shigemi* e métodos padrões para a atribuição (131).

Os experimentos de interação específica da proteína mADK e de seu mutante D310P com o substrato ATP γ S, foram conduzidos analisando a perturbação dos deslocamentos químicos observados em espectros de 2D ¹⁵N ¹H HSQC empregando-se amostras da proteína a 220 µM marcada com ¹⁵N, em experimentos de titulação do substrato. As titulações foram realizadas na proporção de 1:0,05; 1:0,01 e 1:0,2 de mADK:ATP γ S respectivamente. Para ao mutante aplicou-se a proporção de 1:0,1; 1:0,2 e 1:0,5 de D310P:ATP γ S. As variações dos deslocamentos químicos compostos do grupo amídico de cada resíduo, Δ_{1H+15N} , foram calculados de acordo com Kim e colaboradores (132).

3.4.3 Experimentos de interação da mADK e seu mutante D310P com o substrato ATP γ S via RMN-STD

A interação específica entre o substrato ATP γ S e mADK ou seu mutante D310P foi avaliada através da técnica de RMN conhecida como Diferença de Transferência de Saturação (RMN-STD). O STD é atualmente o método mais versátil e usado para a detecção de interações proteína- ligante (133). O experimento de RMN-STD tem como base o fenômeno de NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), que consiste na mudança de população de spins nucleares de uma espécie, por influência de outro spin nuclear dipolarmente acoplado ao primeiro. Como mostrado no esquema da figura 11, a proteína é submetida a uma irradiação seletiva (*on-ressonance*), tendo todos os seus núcleos de hidrogênios magnetizados via difusão de spin e transfere para o ligante situado no sítio ativo através do evento de relaxação cruzada. Um experimento controle é realizado com irradiação fora da janela espectral (*off-ressonance*), onde a análise de espectros de RMN 1D H1 em condições de equilíbrio para todas as magnetizações dos H1 de todas as espécies presentes na solução, onde nenhum sinal foi saturado. Esses dois experimentos são subtraídos e o resultado é a variação da intensidade dos sinais do ligante que

interagem com a proteína. As intensidades dos sinais de STD resultantes, permite a quantificação das contribuições individuais dos principais elementos estruturais do ligante.

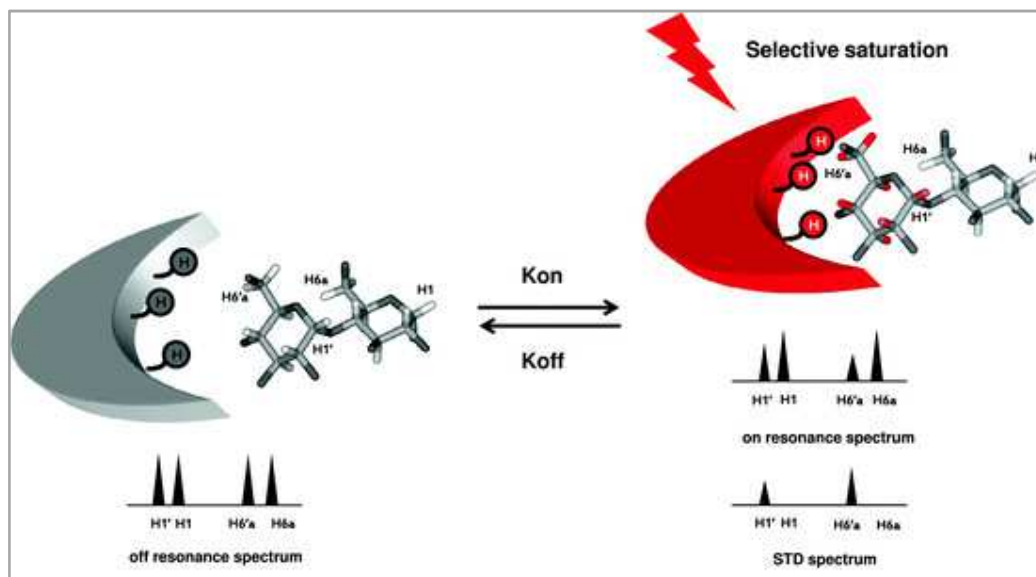


Figura 11. Representação esquemática de um experimento de STD-RMN. As ressonâncias da proteína são seletivamente saturadas (representadas pela seta vermelha) e rapidamente transferidas por difusão de spin através da proteína. A transferência de NOE intermolecular resulta em uma diminuição na intensidade do sinal dos prótons do ligante em contato próximo com a proteína (prótons em vermelho). Graficamente no exemplo, estão mostradas apenas as ressonâncias H1' H6'a. Essas alterações são visivelmente detectadas após a subtração dos espectros (*off* – *on resonance spectrum*), a fim de obter o espectro de diferença chamado espectro de STD (*STD spectrum*), o qual apresenta os sinais do ligante que estava em contato direto com a proteína. (Retirado de Jiménez-Barbero, 2012)(134).

Os experimentos de STD foram realizados empregando-se amostras de 600 μ l de mADK ou do mutante D310P a 1 mM de concentração, na presença de excesso de 400 vezes de substrato ATP μ S. Utilizou-se 2,5 s de irradiação alternando entre 0,5 ppm (*on-ressonance*) e 30 ppm (*off-ressonância*) usando um pulso de entrada de 50 ms Gaussianos e 4096 transientes. Todos os espectros foram processados usando o software NMRPipe / NMRView (41) e SpinWorks.

Tabela 4. Condições experimentais de obtenção dos espectros e STD.

Parâmetros	
Janela espectral (sw)	8kHz
Pontos de aquisição (td)	16K
Tempo de aquisição (aq)	1s
Tempo de espera (dl)	2s
Número de transientes (ns)	8192 (para o STD) e 4096 (para o STDOFF)
lb	1Hz
Tempo de saturação	2s
Trava de spin	50 ms
Pulso seletivo saturação	Gauss, 50 ms, 0,1 ms (<i>interdelay</i>)

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese serão apresentados em formato de artigo, seguindo a configuração alternativa de tese.

4.1 Artigo

Adenosine Kinase couples sensing of cellular potassium depletion to purine metabolism
(publicado – Anexo 1)

Adenosine Kinase couples sensing of cellular potassium depletion to purine metabolism

Renata Rocha de Oliveira¹, Raphael Morales Neto¹, Silvana Aparecida Rocco¹, Maurício Luis Sforça¹, Carla Cristina Polo¹, Celisa Caldana Costa Tonoli¹, Gustavo Fernando Mercaldi¹, Artur Torres Cordeiro¹, Mário Tyago Murakami¹, and Kleber Gomes Franchini^{1,2*}

1. Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.
2. Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13081-970, Brazil.

corresponding author:

Kleber G. Franchini, M.D. Ph.D.

Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro 10000, CP 6192, 13083-970, Campinas/SP, Brazil, Tel 55-19-3512-1013, Fax 55-19-3512-1100.

Email: kleber.franchini@lnbio.cnpem.br

ABSTRACT

Adenosine Kinase (ADK) regulates the cellular levels of adenosine (ADO) by fine-tuning its metabolic clearance. The transfer of γ -phosphate from ATP to ADO by ADK involves regulation by the substrates and products, as well as by Mg^{2+} and inorganic phosphate. Here we present new crystal structures of mouse ADK (mADK) binary (mADK:ADO; 1.2 Å) and ternary (mADK:ADO:ADP; 1.8 Å) complexes. In accordance with the structural demonstration of ADO occupancy of the ATP binding site, kinetic studies confirmed a competitive model of auto-inhibition of ADK by ADO. In the ternary complex, a K^+ ion is hexacoordinated between loops adjacent to the ATP binding site, where Asp310 connects the K^+ coordination sphere to the ATP binding site through an anion hole structure. Nuclear Magnetic Resonance 2D ^{15}N - ^1H HSQC experiments revealed that the binding of K^+ perturbs Asp310 and residues of adjacent helices 14 and 15, engaging a transition to a catalytically productive structure. Consistent with the structural data, the mutants D310A and D310P are catalytically deficient and loose responsiveness to K^+ . Saturation Transfer Difference spectra of ATP γ S provided evidence for an unfavorable interaction of the mADK D310P mutant for ATP. Reductions in K^+ concentration diminish, whereas increases enhance the *in vitro* activity of mADK (maximum of 2.5-fold; apparent $K_d = 10.4$ mM). Mechanistically, K^+ increases the catalytic turnover (K_{cat}) but does not affect the affinity of mADK for ADO or ATP. Depletion of intracellular K^+ inhibited, while its restoration was accompanied by a full recovery of cellular ADK activity. Together, this novel dataset reveals the molecular basis of the allosteric activation of ADK by K^+ and highlights the role of ADK in connecting depletion of intracellular K^+ to the regulation of purine metabolism.

Introduction

Adenosine Kinase (ADK; EC 2.7.1.20) catalyzes the phosphorylation of adenosine (ADO) to 5'-AMP using ATP as a source of phosphate⁽¹⁾. This reaction is a committed step in the purine nucleotide salvage pathway, involved in maintaining the proper levels of cellular nucleotides⁽²⁾. In fact, phosphorylation by ADK keeps the intracellular levels of ADO from building up and maintains an out-in concentration gradient across the cell membrane, which makes the cytosol a sink for extracellular ADO under physiological conditions⁽³⁾. Accordingly, changes in the ADK catalytic activity translate into significant changes in intra- and extracellular ADO. For instance, hypoxia-induced inhibition of ADK potentiates intracellular accumulation and the release of ADO to the extracellular milieu⁽⁴⁾. Similarly, the pharmacological inhibition of ADK increases the levels of ADO and evokes a broad range of adenosine-mediated cell signaling^(5, 6). Also, ADK deficiency caused by loss-of-function mutations leads to the accumulation of ADO in organs such as brain and liver^(7, 8). Although many studies have previously focused on the structure and function of ADK, the mechanisms that regulate the catalytic activity of ADK are not yet fully understood.

Several factors have been shown to affect the activity of ADK. ADO itself is a primary regulator of ADK, as increased levels of intracellular ADO inhibit the enzyme's catalytic activity through a yet unclear mechanism⁽⁹⁾. In this respect, increases in ADO concentration from the nanomolar to the micromolar range are needed to substantially reduce ADK activity, suggesting that this mechanism is unlikely to influence ADK activity before extreme increases of intracellular ADO are reached⁽¹⁰⁾. Besides, ADP, AMP, and Pi in excess, as well as the lack of ATP may all inhibit ADK to some extent⁽¹¹⁻¹⁴⁾. ADK activity increases as the levels of free Mg^{2+} in the reaction increase up to an optimal concentration, after which point additional free Mg^{2+} leads to inhibition of the enzyme⁽¹⁵⁾.

In this study, we determined the crystal structure of mouse ADK (mADK) as a binary complex with ADO (mADK:ADO) bound to the nucleotide-binding site, and as a ternary complex with ADO occupying the high-affinity nucleoside site and ADP the nucleotide-binding site (mADK:ADO:ADP). We demonstrate, for the first time, the presence of a K^+ in the large domain structure of mADK, adjacent to the ATP binding site. Kinetic measurements and mutational data indicate that K^+ influences enzyme activity in such a way that K^+ ion depletion is accompanied by inhibition of ADK. The observation that fluctuations of intracellular K^+

parallel changes in ADK activity further supports this conclusion. Overall, these data motivate us to propose that functionally, inhibition of ADK by low levels of K^+ may serve to regulate the intracellular levels of ADO and other purine metabolites under pathophysiological situations that are accompanied by depletion of the K^+ ion such as ischemia and hypoxia, during which purine metabolites may play a major protective role against cellular injury.

Results

General features of the mADK structures

Crystal structures of $\Delta 19$ mADK complexed with adenosine (mADK:ADO) and full-length mADK complexed with adenosine and adenosine-5'-diphosphate (mADK:ADO:ADP) were determined at 1.2 and 1.8 Å resolution, respectively (Table 1). The final models include the residues 19 to 361 of mADK:ADO (Supplementary Figure 1a) and 20 to 360 of mADK:ADO:ADP (Supplementary Figure 1b). Crystals from mADK:ADO grew in the monoclinic space group $P1_21,1$, while crystals from mADK:ADO:ADP grew in the orthorhombic space group $P2_1,2_1,2_1$. The enzyme consists of two unequally sized domains (i.e., a large three-layer ($\alpha\beta\alpha$) sandwich domain and a small lid α/β domain), closely matched to the previously reported human ADK⁽¹⁶⁾ (Supplementary Figure 2a). The large domain possesses two binding cavities that are the sites for ATP (BS1) and ADO (BS2). The structures shown here feature the BS1 and BS2 binding sites, the catalytic base Asp316 and an anion hole motif (DTNGAG) in the large domain, whereas the small or lid domain contains the residue Arg148 that is involved in binding to ATP (Fig.1). In addition to the substrates of each complex, we observed functionally relevant ions in the ternary complex including one potassium, one chloride and two magnesium ions.

Interactions involved in ADO and ADP binding

In the mADK:ADO complex, electronic density for ADO was identified in the BS1 site, which is a large hydrophobic cluster involving residues Ile308, Val300, Ala314, Phe318, Ala343, Ile347 and polar residues Thr281, Arg284, Asp302, Gln305, His340, Gln303, Thr287, Thr311 and Gln282 (Supplementary Figure 3a). In this site, ADO assumes a standard anti-conformation with a glycosidic torsion angle of -165.4° , while the sugar ring adopts the common C3'-endo conformation. The adenine group is hydrogen bonded to Gln305, involving atoms N1-NE2 and N6-OE1. The ribose ring makes no direct contact with the enzyme but instead establishes water-mediated interactions with the main chain atoms of residues Thr281, Gly283, and His340.

Considering the peculiar occupancy of BS1 by ADO in both mADK (PDB: 5KB6) and HsADK (PDB:1BX4) binary complexes, and the potential importance of such an occupancy to the mechanism of auto-inhibition of ADK by the substrate, we next performed a detailed analysis of the superposed structures of both msADK and HsADK binary complexes (Supplementary Figure 2a). The superposition of these binary complexes showed marked differences between the structures (overall RMSD 3.14Å, 9.74Å to the lid and 0.77Å to the large domain). Distinct from the mADK, the HsADK binary structure assumes a closed conformation ($\sim 34.6^\circ$ bending of the lid over the large domain), which agrees with the notion^(17, 18) that the occupancy of the BS2 site by the substrate is a major factor in determining the closure of the lid over the large domain in the active form of the enzyme. Moreover, a detailed analysis of the BS1 in the superposed structures of mADK and HsADK binary complexes showed that ADO occupies a similar pocket of BS1 in both structures (Supplementary Figure 2b). This configuration suggests that ADO may compete with ATP for the binding to BS1, which could impact on the auto-inhibitory influence of ADO on ADK. Thus, we next sought to explore the potential mechanism of ADO auto-inhibitory influence on ADK. The inhibition of ADK by ADO and the Michaelis-Menten kinetics for ATP are shown in the Figure 2a and 2b, and Supplementary Table 1. In addition, we also show that stepwise increases of ADO reduce the affinity of mADK to ATP, as indicated by the parallel increases of the K_m (Fig. 2c). The mechanism of ADO inhibition was assessed by double reciprocal Lineweaver-Burk plots data (Fig. 2d). The apparent K_m values observed for the ATP are higher, the greater the concentrations of ADO in the assay (Supplementary Table 2), indicating that ADO is a competitive inhibitor for ATP, which corroborates with data from previous kinetic studies⁽¹⁹⁾. Overall the combination of the structural and kinetic data of the present study help to clarify some discrepancies in the literature about the kinetic mechanism and the structural models available for ADK of different species in its apo and complexed forms⁽²⁾. Although our present data do not completely discard the possibility of the existence of an additional regulatory adenosine-binding site in a different region of the enzyme^{(12),(13),(14, 17)}, it seems that, at least for the ADK from mammalian species, this is not the case.

In the mADK:ADO:ADP complex, the electronic density for ADO occupies the BS2 site formed by residues Asn30, Leu32, Leu56, Asp34, Gly79, Gly80, Ser81, Asn84, Cys139, Ala152, Leu150, Leu154, Phe186, Gly313, Asn312 and Asp316 (Supplementary Figure 3b). In this complex, ADO shows a glycosidic torsion angle of -123.3° and a O4'-endo sugar pucker. The adenine ring displays a stacking interaction with Phe186, a hydrogen bond with Ser81 (N3-

N), and interactions through water molecules with Phe186 (O) and Asn30 (OD1). Several hydrogen bonds anchor the ribose moiety: the O2' and O3' atoms bind to the side chain of residues Asp34, Gly80, and Asn84, while the O5' atom interacts with the side chain of the catalytic residue Asp316. In this complex, ADP occupies BS1. This site arises from the edges of β strands β 11, β 12, β 13, β 14 and α helices α 12 and α 13 on the enzyme surface. The adenine group of ADP binds to Gln305 through a hydrogen bond and to Asp302 through a water-mediated interaction. Val300, Ile308, Ile347, Ala343 and Ala314 complete a hydrophobic cluster around the adenine ring (Supplementary Figure 3c). The sugar ring does not interact directly with the enzyme, but it establishes hydrogen bonds with the solvent molecules through its O2' and O3' atoms. The phosphate tail of ADP interacts with the enzyme through an extensive network of direct and water-mediated hydrogen bonds. The O2A atom of the α -phosphate interacts with Thr281 via O γ ¹, Gly283 via N and Mg²⁺. Water molecules and Mg²⁺ mediate additional contacts with the α -phosphate and β -phosphate groups. The β -phosphate also interacts directly with mADK through hydrogen bonds with Arg148 via NH1-O1B from the lid domain, with Asn239 via ND2-O1B, and Gly315 via N-O3B from the large domain. Additional interactions between β -phosphate, Mg²⁺ and water molecules further confer stability to ADP binding to mADK.

Conformational differences between the binary and the ternary mADK complexes

Crystal structures of ADK from different species have been determined and demonstrate a large extent of structural conservation, despite the considerable sequence diversity^(16, 17, 20-24). From these data arises a model in that the binding of ADO to the BS2 site induces a large-scale bending motion of the lid domain toward the large domain, resulting in a "closed" conformation in the active state. Subsequent formation of an anion hole, induced by the binding of ATP, completes the structural requirements for catalysis^(23, 25). The superposition of the binary and ternary mADK structures highlights the large-scale conformational changes expected for the transition of a fully open to a closed form of the enzyme (Fig. 3a). The least-square fitting over all α -carbon atoms resulted in an r.m.s.d deviation between the structures of 3.32Å. The ternary complex is in a closed conformation with the two domains moving by up to 39.4° compared to the binary complex, which assumes a conformation that is reminiscent of the apo form of ADK from *T. brucei*⁽¹⁸⁾ (PDB: 4N08) (Fig. 3b). Besides, we found localized differences between the binary and the ternary complex, which show how binding to the substrates and the changes in closed conformation prepare the enzyme for catalysis (Fig. 3c). In the binary complex, Asn312

(which is an integral part of the anion hole) appears in two alternate conformers as a function of the torsion angle Ψ_1 (*gauche*⁺ and *trans* conformations). However, in the closed ternary complex, it only adopts the *trans* conformation, which results from steric impositions by the C β , C γ , and C α of Arg148 of the lid subdomain. This residue is brought to interact with the β -phosphate of ADP in the closed conformation, which perturbs the segment comprising the Gln303-Ile309 sequence adjacent to the anion hole segment (Fig. 3d). Interestingly, these changes appear to coincide with the presence of K⁺ between the α_{11} - α_{12} and the C-terminal loops.

Atomic detail of the potassium-binding site in mADK

In this study, the high-resolution data along with coordination geometry analysis of the ternary mADK crystal structure enabled the identification of an atomic density corresponding to a K⁺ in the ADK structure (Fig. 4a). The K⁺ binding site locates in the large subdomain surrounded by two loops that span from residues Ile309 to Asn312 (α_{11} and α_{12} loop) and residues Arg348 to Cys352 (C-terminus), adjacent to the BS1 pocket (Fig. 4b). The ion adopts an octahedral geometry with the backbone carbonyl oxygen of residues Asp310, Asn312, Ile346, Arg349 and Gly351 (Fig. 4c). Besides, the critical residue for K⁺ coordination, Asp310, contacts the ion via main and side chains and presents a distinct rotameric conformation in the K⁺-bound form. In the absence of K⁺ (mADK binary complex) this residue is rotated away from the ion (Fig. 4d). Of note, this is the last residue in the conserved anion hole sequence, which is postulated to deprotonate the alcohol function during catalysis. Similar monovalent cation binding sites have been reported for members of the ribokinase family⁽²⁶⁾, suggesting a conserved influence of cation interaction structure on the formation of the anion hole in ADK.

Potassium modulates mADK activity

The role of K⁺ in the mADK catalytic activity was determined by measuring the initial rate of the reaction as a function of chloride salt concentration in the assays (i.e., KCl, LiCl, NaCl) (Fig. 5a). Basal enzyme activity of mADK was still detected under conditions of zero K⁺ concentration in the buffer assay, suggesting that the K⁺ ion is not needed for the basal activity of this enzyme, similarly to what was previously suggested by studies performed in extracts of human placenta⁽²⁷⁾. However, given the difficulties to completely eliminate the K⁺ ion in the biological samples (either from *E. coli* or other sources), one cannot be sure that K⁺ is not

necessary for the basal activity of ADK. In the samples of purified *E. coli* recombinant mADK, the K^+ ion increased the initial rate of the reaction of mADK by 2.5-fold with respect to a buffer without K^+ . The dependence of mADK activation on K^+ is saturable, with maximal kinase activity observed at 40 mM KCl. These data are well described by an equation derived from a one-site binding model. The estimated K_d of 10.4 mM suggests that at the physiological concentration (140 to 150 mEq/L), K^+ fully activates the enzyme. The effects of Na^+ and Li^+ were also measured to ensure that the effects of the monovalent cations on the mADK activity were limited to K^+ and were not dependent on an ionic strength effect. We observed no significant change in the mADK activity with increasing concentrations of NaCl or LiCl. To address the mechanism behind the activation by K^+ , we characterized the enzymatic activity of mADK as a function of the ATP concentration in the presence or absence of 100 mM KCl (Supplementary Table 3). There was a two-fold increase in the apparent K_{cat} values ($K_{cat}^0 = 0.25 s^{-1}$ versus $K_{cat}^{K^+} = 0.46 s^{-1}$), while the apparent K_m remained almost the same with and without K^+ ($K_m^0 = 2.4 \mu M$ versus $K_m^{K^+} = 2.1 \mu M$). In fact, the addition of K^+ to the reaction duplicated the catalytic efficiency (K_{cat}/K_m) from 0.1 to $0.22 s^{-1}/\mu mol$ (Fig. 5b). Next, we examined if the structural integrity of the K^+ binding site would be critical for the influence of this ion on mADK activity. Asp310 was targeted for mutation because structural analysis indicated that this residue is a crucial constituent of the loops that coordinate K^+ binding to mADK (Fig. 4c). We performed mutations D310A, which substitute Asp310 by a neutral residue, and D310P because the Pro residue would be expected to break two interactions and yet affect the volume of the K^+ ion coordination sphere cavity. Of note, as shown in the Supplementary Figures 4a to 4d, all biophysical data supported that the D310A and D310P are well folded and still proficient at the catalytic point of view (Supplementary Table 1), but with reduced affinity (Supplementary Figures 4e to 4h) to ATP (K_m). As expected, both mutations completely abolished the sensitivity of the enzyme to the K^+ (Figure 5c and 5d), which is likely associated to the inability of the enzyme to be activated through conformational transitions induced by the binding to the K^+ ion, similarly to other members of ribokinase family^(26, 28).

Wild-type mADK and D310P mutant ATP interaction by NMR investigation

To further investigate the impact of the D310P mutation on the enzyme interaction with ATP, we next used two- and three-dimensional NMR spectroscopy to compare the wild-type and the

D310P mutant of mADK. 3D NMR experiments used U-labeled mADK for backbone sequential resonance assignments. From the expected 331 peaks, we observed 209 peaks in the ^{15}N - ^1H HSQC, from which we attributed 200 peaks to ADK residues (Supplementary Figure 5a). As shown in the Supplementary Figure 5b, the missing signals are located at multiple stretches of residues. Residues represented in gray were those that were not found in NMR assays. During the titration steps in the ^{15}N - ^1H HSQC protocol saturation of mADK by the ligand some signals appear in the spectra, possibly due to conformational changes, but the overlapped signals turn the spectra crowded and more difficult to attribute them. Moreover, the protein becomes unstable.

Individual 2D ^{15}N - ^1H HSQC spectra from samples of ^{15}N -labeled wild-type and D310P mutant mADK were recorded in titration series with adenosine triphosphate-gamma-S (ATP γ S) for 8 hours, using a 600-MHz spectrometer with a cryoprobe. The proteins were stable under the temperature and buffer conditions of the experiment, as revealed by the analysis of the spectra from the reference samples. We focused on residues around the BS1 site, which showed similar spectra in the reference samples of the wild-type and D310P mutant mADK. Comparing the signals from both wild-type (Fig. 6a) and the mutant D310P mADK (Fig. 6b), we found distinct changes in the 2D ^{15}N - ^1H HSQC spectra during the initial steps of the interaction with ATP γ S. Analysis of the spectra obtained from the titration experiments of the wild-type mADK indicated exchange broadening of residues Gly146, Arg148, Leu150, Asn212, Asn239, Thr281, Thr287, Ile288, Asn304, Gly313, Gly321, and Gly339 (Fig. 6c). However, the spectra of the D310P mutant showed changes restricted to the residues Arg148, Leu150, Asn212, Asn239, and Thr287. Besides, signals from many other residues such as Gly79, Lys98, Gly104, Asn132, Gly137, A140, Ile143, Lys164, Asp167, Leu213, and Phe298 underwent a reduction in intensity (Fig. 6d). The results showed that ATP γ S caused significant chemical shift changes in the wild-type mADK, especially in the residues around the BS1 site. However, the D310P mutant did not present substantial exchange broadening in the residues adjacent to the BS1 site (Gly146, Asn304, Gly321, Gly313 and Gly339). It appears, therefore, that the integrity of the K^+ binding site is crucial to stabilizing the BS1 site, favoring the nucleotide interaction. Considering that D310P mutation might cause ATP binding to BS2, we show in Supplementary Figure 6a a rotated pose to highlight the residues of the mutant mADK that are affected during ATP γ S titration. As noted, residues of the BS2 (shown in orange) (Supplementary Figure 6b)

remained unchanged during ATP titration, indicating that the D310P mutation does not predispose the interaction of ATP to the BS2.

Also, 1D ^1H STD NMR spectra were obtained for the wild-type mADK (Fig. 6e) and for the D310P mutant (Fig. 6f) with ATP γ S (1:400) to assess the modifications in the substrate that result from the interaction with mADK. Signals from ATP γ S H-2 were the ones that underwent the most substantial increase in intensity in the presence of either the wild-type or the mutant mADK. However, the enhancement of the signal (%STD) for the other protons was higher for the wild-type than those for the mutant mADK. The signal-to-noise ratio to the acquisition of the ^1H STD NMR experiments demonstrated a value of approximately 40% lower for the mutant. In the case of ^{15}N - ^1H HSQC titration, a greater amount of substrate was needed to see an initial backbone amide group cross-peak modification. Thus, 1D ^1H STD NMR indicate that the D310P mutant has an unfavorable interaction with ATP γ S relative to the wild-type mADK, which agrees with the kinetic data showing an increased K_m for ATP in the D310P mADK.

Depletion of cellular K^+ is accompanied by ADK inhibition

To test whether fluctuations in the intracellular levels of K^+ could influence the activity of ADK *in vivo*, we performed experiments in HEK297 cells subjected to a previously reported experimental protocol of depletion⁽²⁹⁾, followed by restoration of intracellular K^+ . In agreement with the *in vitro* data, ADK activity was reversibly inhibited when the K^+ concentration in the culture medium was reduced, while the activity was restored when the K^+ levels were gradually increased to normal levels (Fig. 7).

Discussion

ADK is regarded as a regulator of intra- and extracellular levels of ADO and adenylate pools⁽²⁾. The structural, kinetic and mutational results reported in this study reveal that K^+ selectively activates mADK through an allosteric regulatory mechanism shared among the members of the ribokinase family. Also, we report that in cells, depletion of K^+ inhibits ADK, suggesting a link between the intracellular levels of K^+ and the regulation of ADO and adenylate pools through ADK.

Numerous results have demonstrated that many members of the ribokinase family of phosphotransferases can be activated by K^+ ^(25, 26, 28). Structures of the *E. coli* ribokinase,

Salmonella enterica aminoimidazole riboside kinase and *E. coli* phosphofructokinase-2 show a K^+ or the equivalent Cs^+ bound to a conserved site among the family members^(28, 30, 31). Characteristically, the K^+ binding site of the ribokinase family locates between two loops of the large domain, immediately adjacent to an anion hole and the ATP-binding site⁽²⁸⁾. From these studies, a model has been proposed in which the interaction of K^+ with the residues of the loops results in conformational changes that assist the formation of the anion hole, which contributes to the catalytic transfer of the phosphate group from ATP to the substrate. This model can explain the enhanced activity of ribokinase family members upon binding of K^+ . Notably, although structures of ADK from different sources have been shown to possess the conserved structures of the K^+ binding site and the anion hole sequence DTNGAG in the large domain, a definitive structural identification and biochemical characterization of ADK activation by K^+ are shown here for the first time. The high-quality electron density maps of the mADK ternary complex enabled us to model a K^+ between the structurally conserved loops, connecting the C-terminal extremity and $\alpha 13$ (loop 1) to other loop formed by $\alpha 11$ and $\alpha 12$ helices (loop 2). As in other members of the ribokinase family, this site is located nearby the ATP-binding site and the anion hole sequence. The model predicts a K^+ ion hexacoordinated across the carbonyls of residues Arg349, Ile346, Asn312, Gly351 and both side and main chains of Asp310, with oxygen- K^+ distances ranging from 2.6 to 2.8 Å (mean value of 2.7 Å). Asp310 is also an integral part of the anion role. It is interesting to note that the mADK binary complex, which lacks a bound ion in it, retains the structural features of the K^+ binding site. However, superposition of the ternary and binary complexes shows that the presence of K^+ perturbs the entire P-loop segment, comprising the Asn304-Ile309 sequence. These changes are presumed to influence the binding of ATP to its cognate site in the enzyme.

Our biochemical investigations demonstrate that K^+ activates mADK with exquisite specificity over other metal ions such as Na^+ and Li^+ . Consistent with the structural data, single mutations of Asp310 namely D310A and D310P, which disrupt interactions with K^+ , abolished the activating effect of K^+ on mADK. Notably, the dependence of mADK on K^+ is saturable with maximal kinase activity observed at a K^+ concentration of 40 mM, while the activity is very low in the absence of K^+ . The estimated K_d of 10.4 mM suggests that, under the physiological conditions, K^+ fully activates the enzyme. Also, the results point to an influence

of K^+ on the enzyme turnover, as indicated by the two-fold increase in the values of apparent K_{cat} , while the affinity for ATP, as assessed by the K_m , was unaffected by the presence of excess K^+ in the reaction. Thus, the mechanism by which K^+ activates ADK is likely related to the enhanced efficiency of the phosphate transfer, instead of the affinity of ADK for ATP, as has been suggested for other members of the ribokinase family^(28, 30).

Discrepancies regarding the effect of K^+ ion on the kinetics of mADK showed here with data reported for other ion-sensitive enzymes may lead to uncertainty about the functional importance of the K^+ ion to the mADK function. For instance, a 60-fold increase in the enzyme activity induced by increases in the K^+ ion was previously reported to the *E coli* ribokinase⁽²⁸⁾. Similarly, a 10-fold increase in the K^+ ion was reported to enhance the *M tuberculosis* ADK activity by 3-fold⁽³²⁾. The reasons for the apparent discrepancies between our data and those reported in the literature are unclear, however they can likely be due to differences in the methodologies, study designs and source of samples (e.g. purified enzyme vs cell extracts) utilized in the various studies. For instance, many of the studies in the literature lack complete kinetic data, which make the comparisons between the studies a difficult undertaking.

It is also important to note that the K^+ ion is not apparently required for basal mADK, as some level of the enzyme activity is still present in the assays performed without addition of K^+ to their buffer composition. Similarly, previous data obtained in samples of human placenta⁽³³⁾ indicate that the K^+ ion seems not be required for basal activity of human ADK. These data may contradict the notion of a major regulatory role for the K^+ ion on ADK. However, one cannot be sure that the K^+ ion is completely eliminate from the biological samples, even after prolonged dialysis against zero K^+ buffers as discussed below.

Another interesting finding of our study is that cellular depletion of K^+ reduces the activity of ADK. It is worth to note that reductions of intracellular K^+ to very low levels, obtained by a hypotonic zero potassium solution, were sufficient to reduce the activity of intracellular ADK by approximately 80%. This protocol is expected to reduce the intracellular K^+ by approximately 70% of the basal normal levels, which would bring the intracellular levels to 50 mEq/L⁽²⁹⁾. Somehow this may contradict the biochemical data, as a K_d of 10 mM would preclude ADK from being inhibited by the diminished K^+ concentration, meaning that the enzyme would be present only in the bound form. However, one must consider that there is considerable uncertainty as to how much of K^+ exists in the free rather than the bound state, as

the cytoplasm contains numerous species such as nucleic acids, phospholipids, proteins, and small-molecule metabolites with an affinity for K^+ . In fact, ^{39}K NMR data suggest that up to 50% of cytoplasmic K^+ may be in the bound state⁽³⁴⁾. The finding that ADK is inhibited under K^+ depletion conditions is particularly interesting, because ADK is inhibited during hypoxia, a situation that is accompanied by a rapid depletion of intracellular K^+ . Importantly, inhibition of ADK during hypoxia has been postulated to contribute significantly, albeit not exclusively, to the early accumulation of ADO during hypoxia^(3, 4). In fact, a pathophysiological hallmark of the ischemia/hypoxia is the early increase in ADO signaling led by its accumulation in both the intracellular compartment and extracellular space⁽³⁵⁾. Thus, our present data encourages us to speculate that inhibition of ADK by low levels of K^+ serves to regulate the intracellular levels of ADO under pathophysiological situations like ischemia and hypoxia.

Methods

Engineering of mADK variants

Murine *ADK* was amplified from *Mus musculus* cDNA library using primers containing *Bam*HI and *Hind*III restriction endonucleases sites. PCR product was cloned into a pET28a expression vector comprising a sumo-cleavable N-terminal His6-tag to produce two mADK WT constructs (denoted Full_mADK Met1 for His362 and Δ 19mADK Leu20 – Phe360, residues respectively). D310A and D310P site-directed mutagenesis were performed on pET28a-full_mADK using the QuikChange II XL (Stratagene) method, DNA was transformed into DH5 α competent cells and the mutations were confirmed by DNA sequencing.

Expression and purification

mADK and mutants were produced in *E. coli* BL21(DE3) strain (Novagen). The expression conditions were 0.5 mM isopropyl β -D- thiogalactopyranoside at 293K for 18 hours. Frozen pellets were thawed, sonicated and clarified by centrifugation. The purification steps comprised the nickel-affinity with a HisTrap 5 ml (GE Healthcare) employed buffer A (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, and 300 mM sodium chloride), buffer B (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.8, 300 mM sodium chloride, 10% v/v glycerol and 10 mM imidazole) and the elution step in buffer C (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, 300 mM sodium chloride, 10% v/v glycerol and 500 mM imidazole). After obtaining of fractions containing mADK_HisTAG, a cleavage of the His6-tag was performed during dialysis step into Buffer B,

using Ubl-specific protease at 4 °C over 16 hours. Adsorption of the cleaved 6His-tag, was performed by an affinity purification step by Ni²⁺ resin and the mADK without 6His-tag was obtained in a flow- through fraction. The protein was concentrated using Amicon ultrafiltration cell (10K MW cutoff membrane – EMD/Millipore). The protein was submitted to a size-exclusion chromatography step (Hiload 16/60 Superdex 75 prep grade) in buffer D (20 mM sodium phosphate buffer pH 7.8, 300 mM sodium chloride, 10% v/v glycerol, 5 mM imidazole and 1mM dithiothreitol). mADK WT was concentrated to ~18 mg ml⁻¹ for crystallization trials.

Biophysical characterization of the mutants

Secondary structure prediction and thermal denaturation of the D310A and D310P mutants were performed by circular dichroism in Jasco J810 CD spectropolarimeter. The wild-type enzyme was used as default. Spectra of 5 µM of mADK WT and mutants were recorded in a buffer 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.5 and 10 mM NaCl between 198 and 260 nm in a 1 mm optical path length cuvette. The denaturation was monitored at 222 nm with a temperature increase of 1°C increments with 2 minutes equilibration time between data points. The percentage of unfolded protein was calculated by assuming samples were completely folded and unfolded between 30 °C and 90 °C, respectively.

Crystallography

mADK WT was crystallized by the sitting drop vapor diffusion method in droplets composed of one part protein solution (18 mg/ml) to one part reservoir solution (lithium sulfate 0.2M, sodium acetate 0.1M and PEG 400 50%) for the mADK:ADO complex and one part reservoir solution (PEG 400 40%, PEG 1000 15% and sodium di-potassium phosphate) for mADK:ADO:ADP. Crystals appeared in approximately 7 days at 18 °C. The complexes were prepared by previous incubation with 2.5 mM adenosine (ADO) and adenosine diphosphate (ADP) at 4°C for 16 hours.

Data collection, processing and refinement

Data were collected at the MX2 beamline (LNLS, Campinas, Brazil) using 1.458 Å wavelength X-ray. As many as 360 images were obtained using an oscillation angle of 0.5° and an exposure time of 20 s for the complex mADK-ADO and 30 s for the other set of data. The detector distance was set to a maximum resolution of 1.2 and 1.8 Å for mADK:ADO and mADK:ADO:ADP, respectively. A charge-coupled device (CCD), MAR Mosaic 225 (MAR

Research) was used to record the intensities. Data were indexed and scaled using Denzo and Scalepack from the HKL-2000 package⁽³⁶⁾. The structure of mADK:ADO was solved by molecular-replacement calculations using the program Phaser^(37, 38) with the HsADK as a template (PDB entry 1BX4)⁽¹⁶⁾. The mADK refined coordinates from the mADK:ADO crystal was further used to find an MR solution for the mADK:ADP complex. Both structures were refined using REFMAC5⁽³⁹⁾. In the mADK:ADO structure, the thermal parameters of all non-hydrogen atoms were treated anisotropically, whereas, in the mADK:ADP, TLS parametrization was applied. Following each cycle of refinement, the model was manually adjusted to correspond to computed weighted (2Fo-Fc) and (Fo-Fc) electron density maps using the program Coot⁽⁴⁰⁾. Water molecules were manually added at positive peaks above 1.8 Å in the difference Fourier maps, taking into consideration hydrogen-bond distances. The refined structures were evaluated using the program MolProbity⁽⁴¹⁾. Refinement statistics are summarized in Table 1. The images *were generated* using PyMol Molecular Graphics System, version 2.1.1 Schrödinger, LLC.

Kinase activity assay

mADK activity was performed by monitoring the resorufin fluorescence produced by a coupled kinases system based on the ADP consumption⁽⁴²⁾, catalytic product of the mADK reaction. The ADP enters as substrate into a coupled assay that employs Pyruvate kinase (20 UI/mL), Horseradish peroxidase (2UI/mL), Pyruvate oxidase (1UI/mL), phosphoenolpyruvate (0.3 mM) and cofactors thiamine pyrophosphate (100 µM), flavin adenine dinucleotide (10 µM), 10-acetyl-3,7- dihydroxyphenoxazine (35 µM) responsible to convert ADP in hydrogen peroxide, which in turn is oxidized to form resorufin. The fluorescence was quantified by 530-570 nm of excitation and emission at 590 nm in an *EnVision®* Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer). The assays were performed at 303 K for 30–60 minutes. The kinetic parameters of the mADK WT were assayed employing 15nM enzyme with serial dilutions to ADO or ATP (0 to 40 µM) fixing ATP (20 µM) or ADO (10 µM) in a reaction buffer 50 mM Tris-HCl pH = 7.5, 20 mM KH₂PO₄, 10 mM MgSO₄ and 0.01% Triton X-100. Kinase activity for the D310A and D310P mutants, were performed with 150nM enzyme, substrates varying ADO 0 to 80 µM (in the presence of 50 µM ATP) and varying ATP 0 to 320 µM (in the presence of 50 µM ADO) (Supplementary Table S1). All kinetic data were normalized extrapolating the values obtained by the standard ADP curve (RFU/s *versus* [ADP] µM). kinetic parameters were analyzed using

the program GraphPad Prism 6.07 version with non-linear fitting substrate inhibition and the Michaelis-Menten equations.

Potassium activation assay

Before kinetic activity measurements, mADK and the mutants (D310A and D310P) were exhaustively dialyzed against 30 mM Tris-HCl (pH 7.5). For the investigation of activation by monovalent cation, the following conditions were employed: 15 nM mADK WT with 10 μ M ADO and 20 μ M ATP, and for the mutants, was used 150 nM enzymes in the presence of 50 μ M ADO and 50 μ M ATP. The assay was performed in a reaction buffer without potassium, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgSO₄ and 0.01% Triton X-100 using dose-response curve of KCl, LiCl or NaCl from 0 to 160 mM. The activity assays were measured at 303K and the kinetic parameters were analyzed using the program GraphPad Prism 6.07 version with one site total curve fitting.

NMR analysis

NMR data were collected at 298 K using an Agilent DD2 500 MHz or Inova 600 MHz spectrometer equipped with a triple-resonance (¹⁵N/¹³C/¹H) cryogenic probe. NMR samples were prepared in a 20 mM sodium phosphate buffer, pH7.5, 50 mM sodium chloride, 40 mM potassium chloride, 2 mM magnesium chloride, 1 mM DTT containing 5% D₂O/95% H₂O. Spectra for sequential resonance assignment of mADK were acquired from 330 μ L samples of 0.5 mM ²H/¹³C/¹⁵N protein using a Shigemi tube. Trosy version of the following experiments was recorded: HNCACB, HN(COCA)CB, HN(CO)CA, HNCA, HNCO and HN(CA)CO using standard methods for the assignment⁽⁴³⁾. The specific binding of small molecule substrates to mADK or the D310P mutant was monitored by changes of signals of 220 μ M ¹⁵N-labeled enzyme in 2D ¹⁵N- ¹H HSQC spectra by titration with the substrate. Also, the binding of small molecules was followed by ligand-detected saturation transfer difference (STD) experiments⁽⁴⁴⁾. STD spectra were acquired using 600 μ L samples of 1 μ M unlabeled mADK or the D310P mutant in the presence of a 400-fold excess of ATP μ S substrate with 2.5s irradiation alternating between 0.5 ppm (on-resonance) and 30ppm (off-resonance) using a train of 50 ms Gaussian pulses and 4096 transients. All spectra were processed using NMRPipe/NMRView^(45, 46) and SpinWorks software.

Intracellular potassium depletion

1×10^7 HEK293 cells were grown in a monolayer, seeded into a petri dish (150mm x 15mm) containing 20 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 pg/ml streptomycin, 2mM glutamine and 1mM sodium pyruvate. Cells were grown at 310K and 5%CO₂. On day 3, cell growth reached 80% confluence, intracellular potassium was depleted by the Larkin method with modifications⁽²⁹⁾. The medium was discarded off each plate and washed in 15 ml Buffer A (50 mM sodium-Hepes and 100 mM NaCl at pH 7.4). Each cell monolayer was subjected to 10 minutes incubation in 15 ml hypotonic medium (DMEM/ water, 1:1), followed by incubation during 30 minutes in an isotonic K⁺- free Buffer (50 mM sodium-Hepes, 140 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ at pH 7.4). The medium was removed and the monolayer incubated with the appropriate potassium concentration ((CT (DMEM), 0mM KCl, 2.5mM KCl and 5mM KCl)) in 15 ml Buffer B (50 mM sodium-Hepes, 140 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ at pH 7.4) over 90 minutes. After incubation, the cells were collected and centrifuged (500xg, 5 min, 298K). An aliquot of the cells in each conditional was submitted to flow cytometry for counting and normalization. The lysate the cell lysates were subjected to ADK activity assays.

Quantification and statistical analysis

GraphPad Prism 6.07 was used for graphics and analyses. Curve fitting for kinetic constants was performed using non-linear fit - equations choose one site total, enzyme kinetics to Michaelis-Menten or Substrate Inhibition.

References

1. J. R. Arch, E. A. Newsholme, The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem* 14, 82-123 (1978).
2. D. Boison, Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev* 65, 906-943 (2013).
3. A. Deussen, M. Stappert, S. Schäfer, M. Kelm, Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99, 2041-2047 (1999).
4. F. Bontemps, M. Mimouni, G. Van den Berghe, Phosphorylation of adenosine in anoxic hepatocytes by an exchange reaction catalysed by adenosine kinase. *Biochem J* 290 (Pt 3), 679-684 (1993).
5. K. Golembiowska, T. D. White, J. Sawynok, Adenosine kinase inhibitors augment release of adenosine from spinal cord slices. *Eur J Pharmacol* 307, 157-162 (1996).
6. M. F. Jarvis et al., ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2, 3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: I. In vitro characterization and acute antinociceptive effects in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 1156-1164 (2000).
7. M. K. Bjursell et al., Adenosine kinase deficiency disrupts the methionine cycle and causes hypermethioninemia, encephalopathy, and abnormal liver function. *Am J Hum Genet* 89, 507-515 (2011).
8. C. Staufner et al., Adenosine kinase deficiency: expanding the clinical spectrum and evaluating therapeutic options. *J Inherit Metab Dis* 39, 273-283 (2016).
9. E. A. Newsholme, M. N. Fisher, Adenosine kinase and the control of adenosine concentration in the heart. *Biochem J* 226, 344 (1985).
10. P. Lönnroth, P. A. Jansson, B. B. Fredholm, U. Smith, Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol* 256, E250-255 (1989).
11. M. Maj, B. Singh, R. S. Gupta, The influence of inorganic phosphate on the activity of adenosine kinase. *Biochim Biophys Acta* 1476, 33-42 (2000).
12. T. D. Palella, C. M. Andres, I. H. Fox, Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition. *J Biol Chem* 255, 5264-5269 (1980).
13. C. F. Hawkins, A. S. Bagnara, Adenosine kinase from human erythrocytes: kinetic

studies and characterization of adenosine binding sites. *Biochemistry* 26, 1982-1987 (1987).

14. P. Rotllan, M. T. Miras Portugal, Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *Eur J Biochem* 151, 365-371 (1985).

15. M. C. Maj, B. Singh, R. S. Gupta, Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry* 41, 4059-4069 (2002).

16. Mathews, II, M. D. Erion, S. E. Ealick, Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry* 37, 15607-15620 (1998).

17. M. C. Reddy et al., High resolution crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* adenosine kinase: insights into the mechanism and specificity of this novel prokaryotic enzyme. *J Biol Chem* 282, 27334-27342 (2007).

18. J. Timm, D. Gonzalez-Pacanowska, K. S. Wilson, Structures of adenosine kinase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70, 34-39 (2014).

19. M. N. Fisher, E. A. Newsholme, Properties of rat heart adenosine kinase. *Biochem J* 221, 521-528 (1984).

20. W. J. Cook, L. J. DeLucas, D. Chattopadhyay, Crystal structure of adenosine kinase from *Toxoplasma gondii* at 1.8 Å resolution. *Protein Sci* 9, 704-712 (2000).

21. S. Kuettel et al., Crystal structures of *T. b. rhodesiense* adenosine kinase complexed with inhibitor and activator: implications for catalysis and hyperactivation. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1164 (2011).

22. S. W. Muchmore et al., Crystal structures of human adenosine kinase inhibitor complexes reveal two distinct binding modes. *J Med Chem* 49, 6726-6731 (2006).

23. M. A. Schumacher et al., Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J Mol Biol* 298, 875-893 (2000).

24. Y. Zhang, M. H. El Kouni, S. E. Ealick, Structure of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase in complex with an ATP analog at 1.1 angstroms resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 140-145 (2006).

25. J. A. Sigrell, A. D. Cameron, S. L. Mowbray, Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J Mol Biol* 290, 1009-1018 (1999).

26. M. J. Page, E. Di Cera, Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. *Physiol Rev* 86, 1049-

1092 (2006).

27. M. C. Hurley, T. D. Palella, I. H. Fox, Human placental deoxyadenosine and deoxyguanosine phosphorylating activity. *J Biol Chem* 258, 15021-15027 (1983).
28. C. E. Andersson, S. L. Mowbray, Activation of ribokinase by monovalent cations. *J Mol Biol* 315, 409-419 (2002).
29. J. M. Larkin, M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33, 273-285 (1983).
30. C. A. Ramírez-Sarmiento et al., The folding unit of phosphofructokinase-2 as defined by the biophysical properties of a monomeric mutant. *Biophys J* 108, 2350-2361 (2015).
31. Y. Zhang, M. Dougherty, D. M. Downs, S. E. Ealick, Crystal structure of an aminoimidazole riboside kinase from *Salmonella enterica*: implications for the evolution of the ribokinase superfamily. *Structure* 12, 1809-1821 (2004).
32. M. C. Long, V. Escuyer, W. B. Parker, Identification and characterization of a unique adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 185, 6548-6555 (2003).
33. M. C. Hurley, B. Lin, I. H. Fox, Regulation of deoxyadenosine and nucleoside analog phosphorylation by human placental adenosine kinase. *J Biol Chem* 260, 15675-15681 (1985).
34. B. Richey et al., Variability of the intracellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. *J Biol Chem* 262, 7157-7164 (1987).
35. H. K. Eltzschig, D. L. Bratton, S. P. Colgan, Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 13, 852-869 (2014).
36. Z. Otwinowski, W. Minor, [20] Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 276, 307-326 (1997).
37. T. C. Terwilliger et al., Interpretation of ensembles created by multiple iterative rebuilding of macromolecular models. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 597-610 (2007).
38. A. J. McCoy et al., Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658-674 (2007).
39. G. N. Murshudov et al., REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 355-367 (2011).
40. P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta*

Crystallogr D Biol Crystallogr 60, 2126-2132 (2004).

41. V. B. Chen et al., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66, 12-21 (2010).
42. N. W. Charter, L. Kauffman, R. Singh, R. M. Eglen. generic, homogenous method for measuring kinase and inhibitor activity via adenosine 5'-diphosphate accumulation. J Biomol Screen 11, 390-399 (2006).
43. M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 34, 93-158 (1999).
44. M. Jaeger, B. Rothacker, T. Ilg, Saturation transfer difference NMR studies on substrates and inhibitors of succinic semialdehyde dehydrogenases. Biochemical and Biophysical Research Communications 372, 400-406 (2008).
45. F. Delaglio et al., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J Biomol NMR 6, 277-293 (1995).
46. B. A. Johnson, R. A. Blevins, NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. Journal of Biomolecular NMR 4, 603-614 (1994).

FIGURE AND LEGENDS

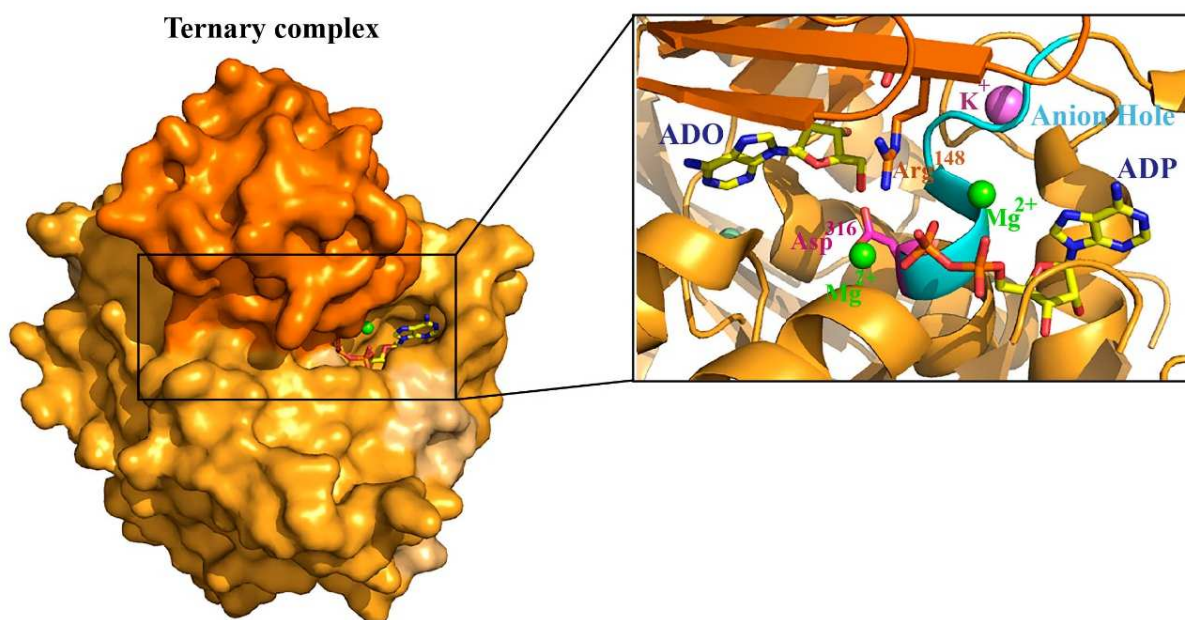


Figure 1. Crystal structure of mADK ternary complex highlighting the catalytic pocket, bound ADP (BS1) and ADO (BS2) and functionally relevant ions. The structure is represented in surface, highlighting the lid domain in dark orange and the large domain in light orange colors. ADP and ADO are represented in yellow sticks with carbon, oxygen, nitrogen and phosphorus atoms colored as yellow, red, blue and orange, respectively. Arg148 (orange stick), Asp316 catalytic residue (pink stick), the anion hole motif DTNGAG (cyan region), ADO in the BS2, ADP in the BS1, two magnesium ions (green spheres), one chloride ion (palecyan sphere) and one potassium ion (purple sphere).

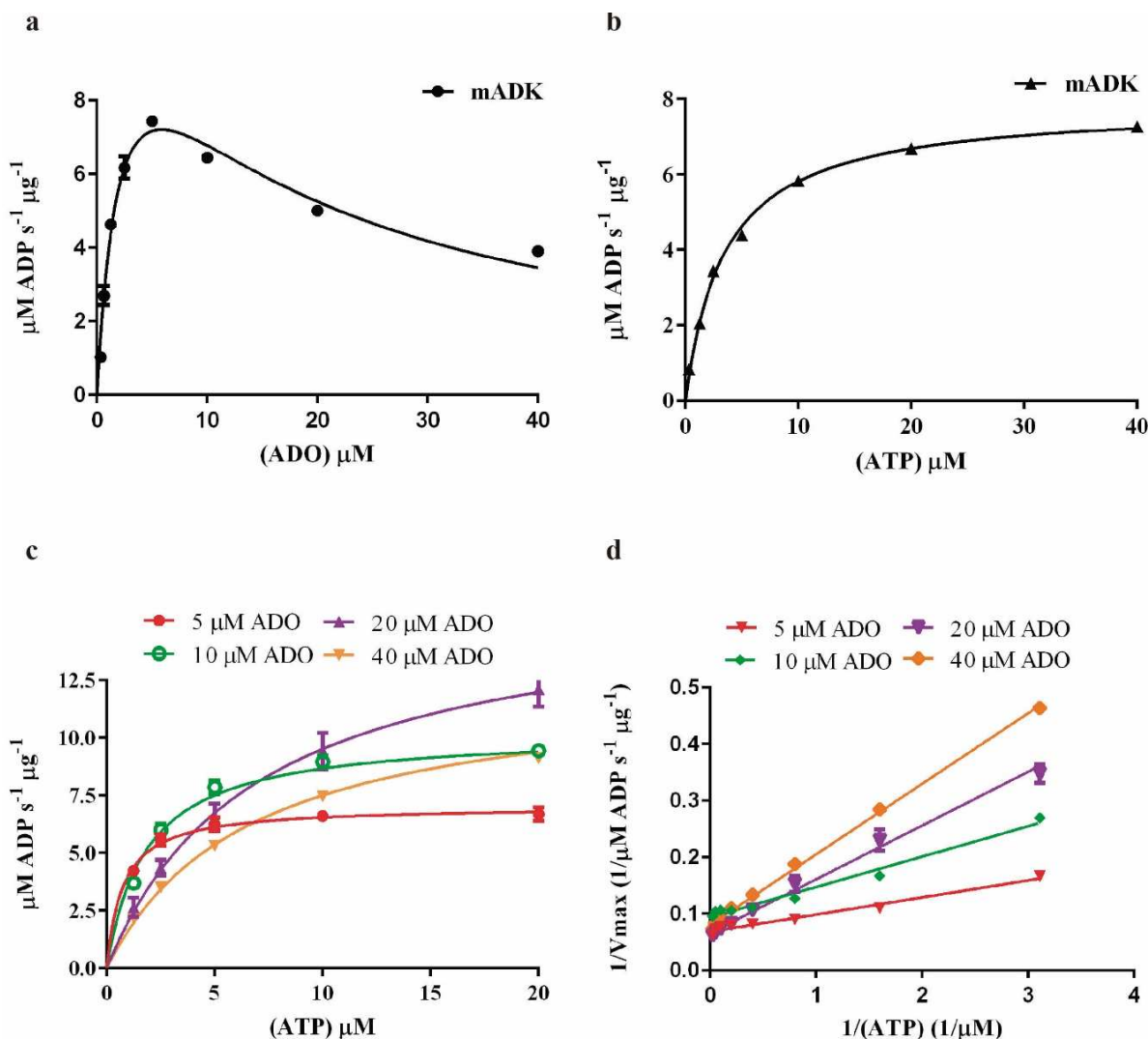


Figure 2. Determination of mADK kinetic parameters and substrate inhibition study. The mADK kinase activity was monitored through resorufin fluorescence which is directly related to the amount of ADP converted to the ADHP (10-acetyl-3,7- dihydroxyphenoxazine) dye precursor. The signals were measured at 530 nm (excitation) and 590 nm (emission) wavelengths. **(a)** Apparent K_m curve for ADO, employing 15 nM mADK, 20 μM ATP and ADO from 0 to 40 μM . ADO concentrations above 5 μM inhibited the mADK. **(b)** K_m curve for ATP, employing 15 mM mADK, 10 μM ADO and ATP from 0 to 40 μM . mADK presented characteristic Michaelis Menten Kinetic for the ATP substrate. Constants for ADO and ATP are shown in Supplementary Table 1. **(c)** *Substrate competition* studies evaluated by ATP K_m curves over a range of ADO concentrations (5, 10, 20 and 40 μM). Stepwise increases of ADO reduce the affinity of mADK to ATP, as indicated by the parallel increases of the K_m (Supplementary Table 2). **(d)** The mechanism of ADO inhibition was assessed by double reciprocal Lineweaver-Burk plots of $1/v$ versus $1/[\text{ATP}] \mu\text{M}$ data, which revealed that ADO is a competitive inhibitor of ATP. Reactions were carried out at 303 K.

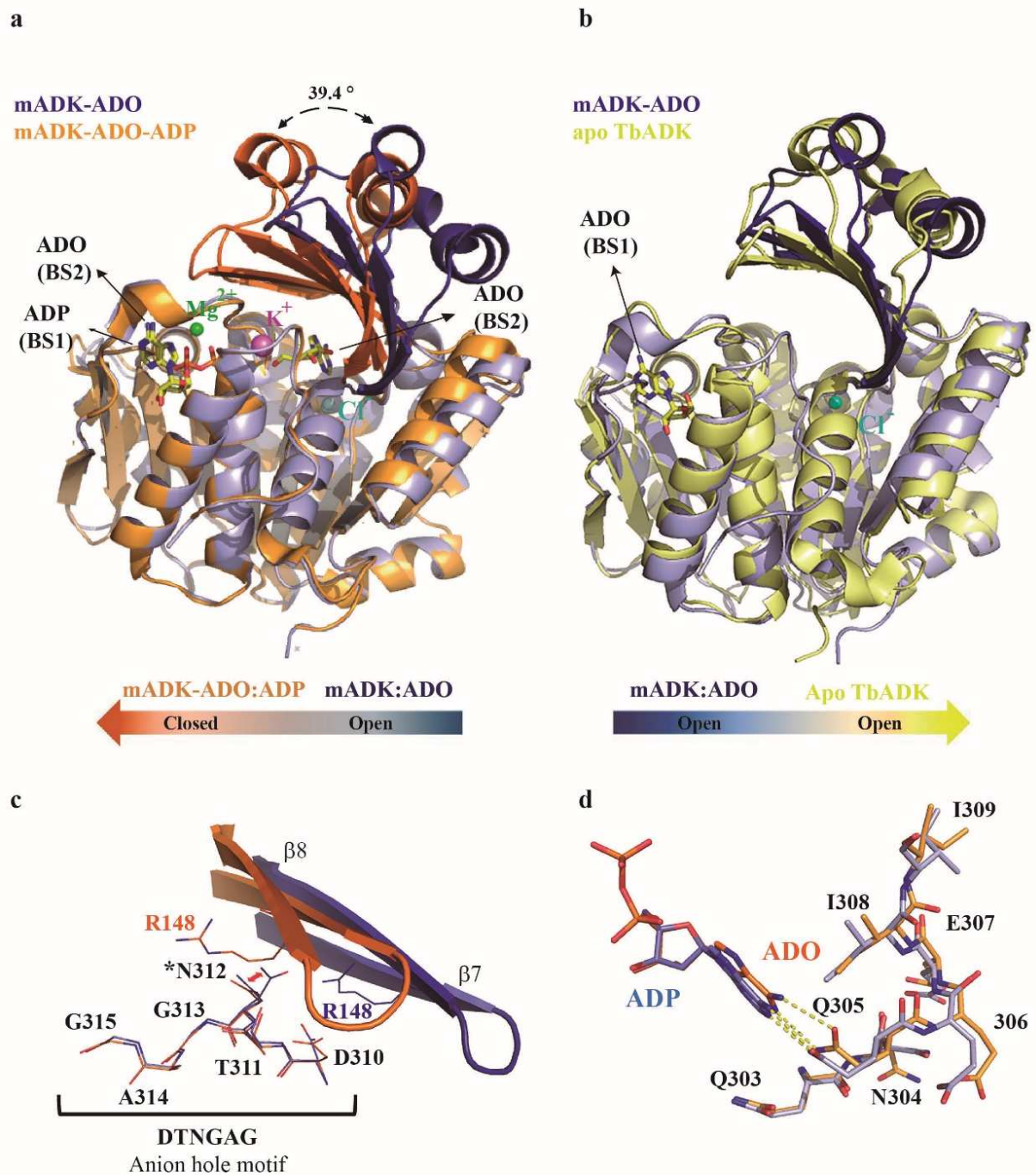


Figure 3. The mADK lid domain dynamics. (a) Superposed crystal structures of mADK binary (blue) and ternary complex (orange). The lid domain moves 39.4° over the large domain, causing the transition between a fully open and a closed conformation. The Mg^{+2} (green spheres) and K^{+} (purple sphere) ions were observed only in the ternary closed complex. The substrates are shown as sticks with carbon, oxygen, nitrogen and phosphorus atoms colored as yellow, red, blue and orange, respectively. (b) Superposed mADK binary complex (blue) and

apo *T. brucei* apo form structure (PDB code: 4N08) (yellow). The lid domains of both structures are in the fully open conformation. **(c)** Superposed lid domain of the binary (blue) and ternary mADK (orange) complexes. The rotation of the lid domain results in the translocation of Arg148 residue about the active site, being able to interact with the β -phosphate of the ADP (ADP not shown). The anion hole residues (DTNGAG) are shown in sticks in both complexes. The asterisk highlights the Asn314 that exhibit a different conformation at an open lid form (binary complex) in relation to closed lid domain (ternary complex). **(d)** Influence of the potassium ion on the ATP P-loop residues conformation (Glu303-Ile309), continuous segment to anion hole. The Glu305 residue shows a distinct conformation in the ternary complex leading to a different position of the ADP adenine ring.

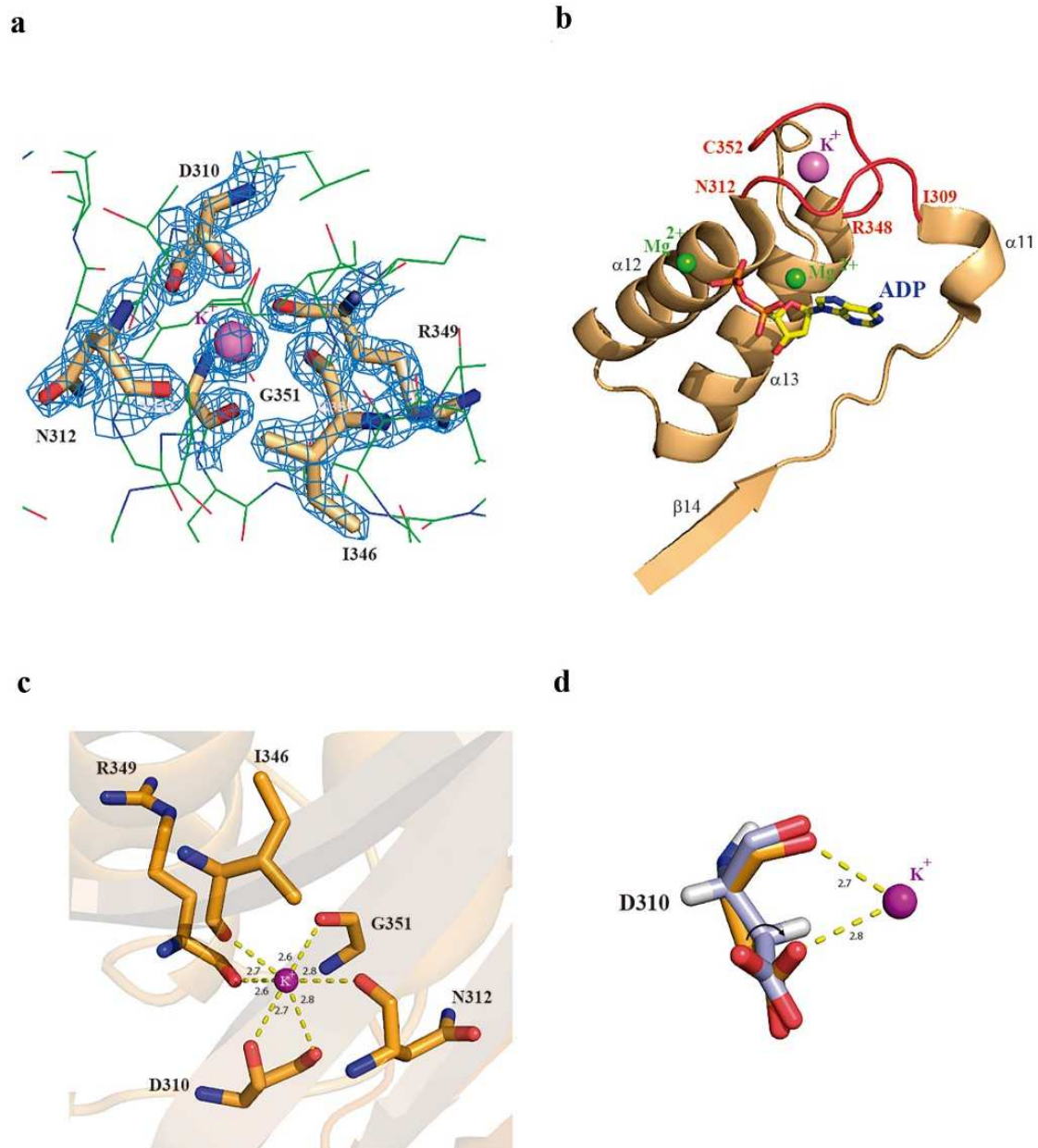


Figure 4. Putative K^+ binding site in the mADK. (a) F_0 - F_c electron density of the K^+ binding site. (b) The loops (colored in red) are surrounding the K^+ binding site. Loops Ile309-Asp312 (α 11 and α 12 loop) and Arg348-Cys352 (C-terminus), adjacent to the BS1 pocket. The ADP molecule is shown as sticks with carbon, oxygen, nitrogen and phosphorus atoms colored in yellow, red, blue and orange, respectively. Two Mg^{2+} (green spheres) and K^+ (purple sphere) ions are shown in the figure. (c) K^+ is hexacoordinated by the backbone carbonyl oxygens of residues Asp310, Asn312, Ile346, Arg349 and Gly351. (d) Asp310, residue belonging to the anion hole, presents a distinct rotameric conformation in the K^+ -bound form (mADK ternary complex) and an additional bond is observed (OD1- K). In the absence of K^+ (mADK binary complex) this residue is rotated.

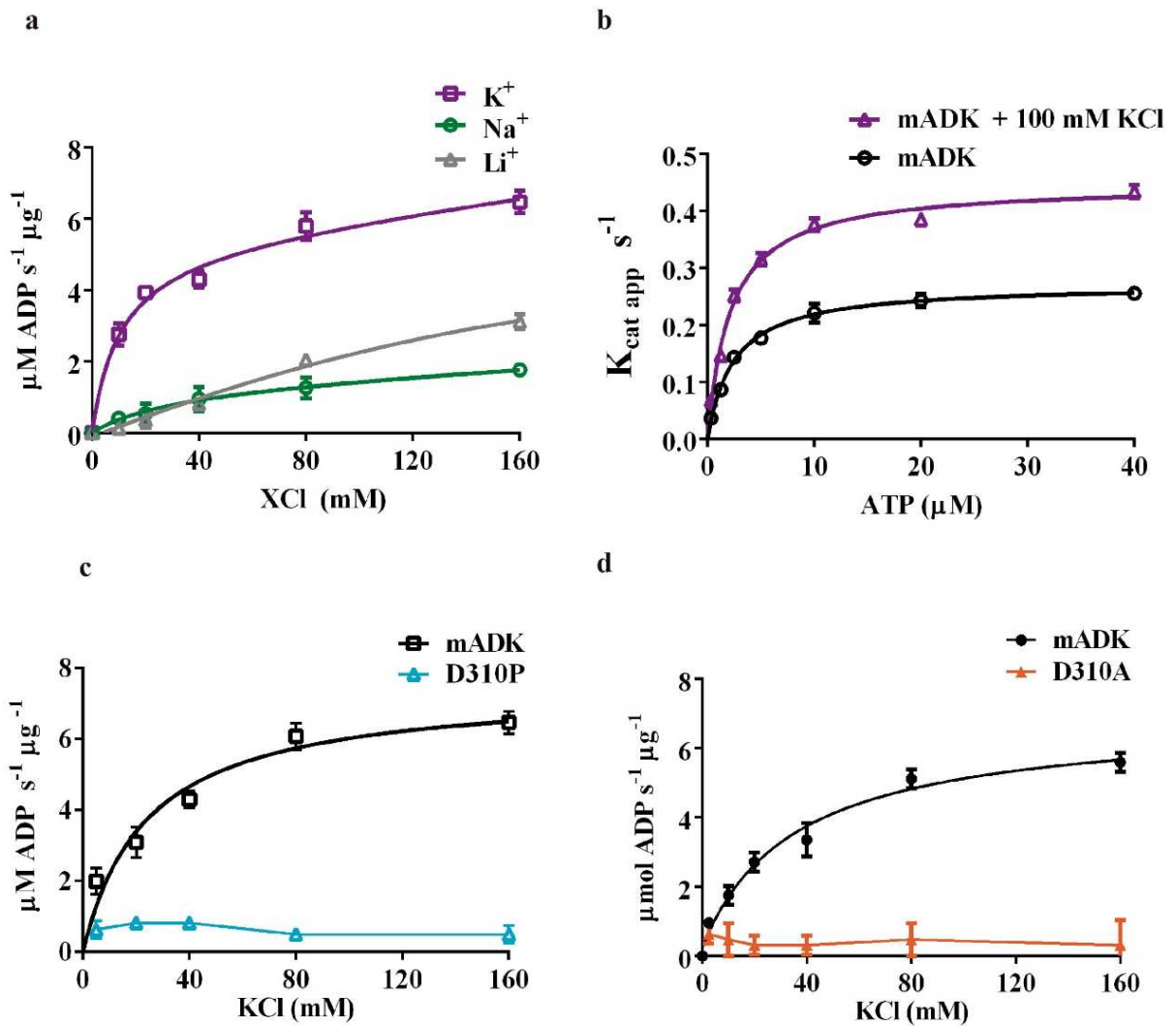


Figure 5. Activation of mADK by K⁺. (a) mADK kinase activity in the presence of chloride salts (KCl, NaCl and LiCl). The initial rate of the reaction of mADK was measured varying chloride salts from 0 to 160 mM. The reaction conditions were, 15 nM mADK, 20 μM ATP and 10 μM ADO. K_d average value obtained was 10.4 ± 2.30 mM and was estimated by one site total equation fitting by Prism 6.1 software (R square of 0.988 (K⁺)). There was no coherent fit for sodium and lithium salts. (b) K_{cat} curves performance in the presence and absence of potassium. Initial rate of mADK reaction was measured in function of ATP in the presence (purple line) or absence (black line) of 100 mM potassium. Apparent K_{cat} values were obtained by the V_{max} (μM ADP. s⁻¹)/ [mADK](μM). Continuous line represents the Michaelis Menten model fitting. Kinetic constants are shown in the Supplementary Table 3. (c) Effect of the D310A and (d) D310P mutations in the activation of mADK by K⁺. Both mutants abolished the mADK activation by the K⁺ ion.

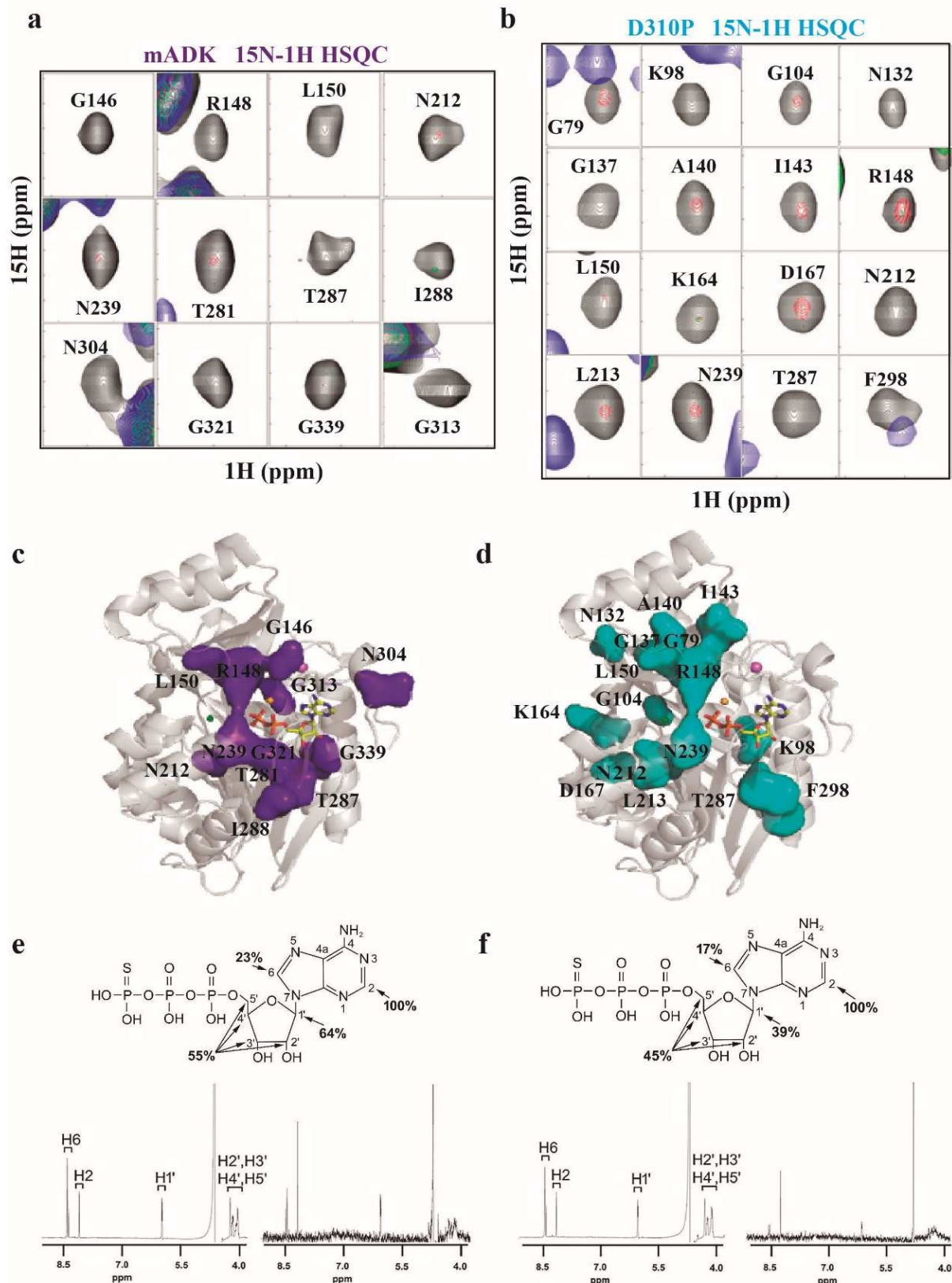


Figure 6. D310P mutation disrupts K⁺ sensitivity of mADK. (a) mADK and (b) D310P mutant analyzed by 2D ¹⁵N-¹H HSQC. In the 2D ¹⁵N-¹H HSQC spectra, the black, red, green

and blue peaks represent chemical shifts changed ATP γ S titration ratio of: free WT in black; 1:0.05 in red; 1:0.1 in green and 1:0.2 in blue. For the free D310P mutant, peak is black, followed by 1:0.1 in red, 1:0.2 in green and 1:0.5 in blue. **(c)** and **(d)** represent mapping of the broadened residues for mADK and D310P mutant respectively. Broadened residues are featured using as a model, the ternary mADK complex structure (PDB 5KB5). 1D ^1H STD NMR spectra of ATP γ S interaction with mADK **(e)** and D310P **(f)**. Enhancements are referred to as 100% to the H-2 resonance of ATP γ S. Upper part shows the ATP γ S structure with the number for each proton and the % STD enhancement.

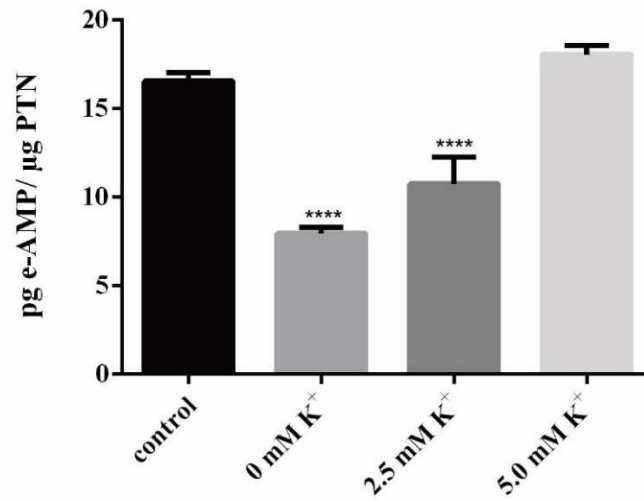


Figure 7. K⁺ depletion reduces the mADK activity in cells. HEK293 monolayers were subjected to hypotonic shock by 30 minutes followed by incubation in an isotonic K⁺-free Buffer. After this, the cells received K⁺-Buffer (0, 2.5 and 5 mM KCl) and the control cells received a DMEM medium. The cells were remained by 1 hour under each evaluated condition. After the treatments, the cells were lysed and the kinase activity (pg e-AMP/μg PTN) measured by HPLC quantification analysis. Statistical analysis: one-way ANOVA. Post hoc test: Bonferroni (*For control P < 0.05)(Error bars represent 6 SD of the mean).

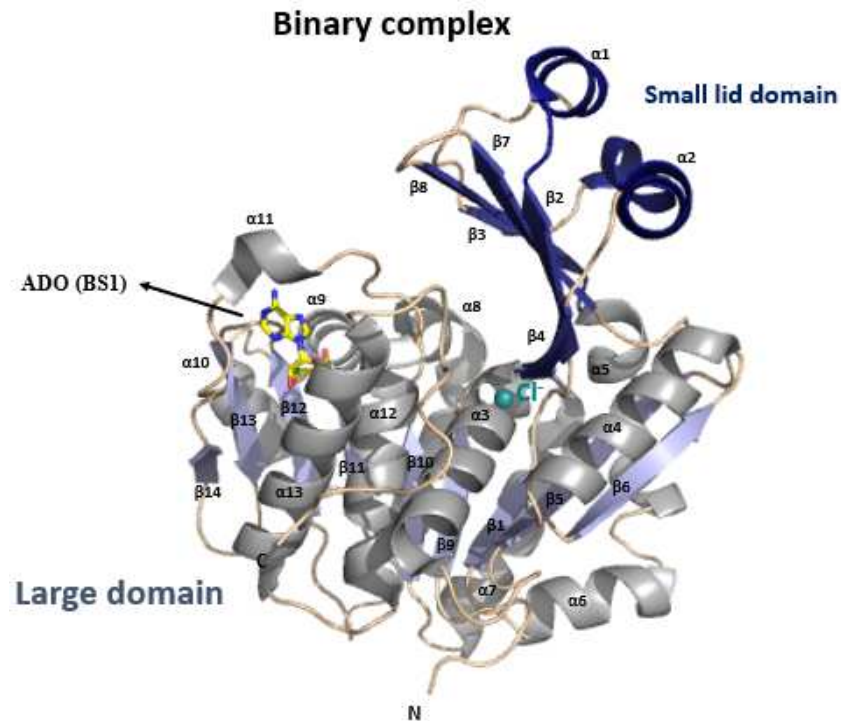
Table 1: Data collection and refinement statistics.

	ADO complex	ADO:ADP complex
Wavelength (Å)	1.458	1.458
Resolution range	20.13 - 1.20	24.63 - 1.80
	(1.24 - 1.20)*	(1.86 - 1.80)
Space group	P 1 2 ₁ 1	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell parameters	50.84, 82.16, 89.19	49.26 73.56 84.33
(Å, °)	90, 92.7, 90	90, 90, 90
Unique reflections	227,981 (22,546)	28,498 (2,773)
Multiplicity	4.0 (3.8)	4.2 (4.1)
Completeness (%)	99.9 (99.8)	98.8 (97.7)
Mean I/sigma(I)	22.9 (2.02)	12.8 (2.04)
R-meas	0.054 (0.653)	0.058 (0.609)
Reflections used in refinement	216,557 (22,527)	27,048 (2,773)
Reflections used for R-free	11,429 (1,099)	1,450 (138)
R-work	0.141 (0.274)	0.165 (0.237)
R-free	0.159 (0.299)	0.199 (0.258)
Protein residues	686 (2 chains)	341 (1 chain)
Ligands	2 ADN, 2 CL, 3 PG4, 2 SO4 and 2 ACT	1 ADN, 1 ADP, 1 K, 1 CL, 2 MG, 2 PG4 and 2 PO4
RMS(bonds)	0.010	0.018
RMS(angles)	1.38	1.85
Ramachandran favored (%)	97.6	97.4
Ramachandran allowed (%)	2.4	2.6
Ramachandran outliers (%)	0	0
Rotamer outliers (%)	0.52	0.35
Clashscore	1.90	4.74
Average B-factor	20.01	24.21
Macromolecules	19.44	24.16
Ligands	21.94	28.55
Solvent	31.54	30.50

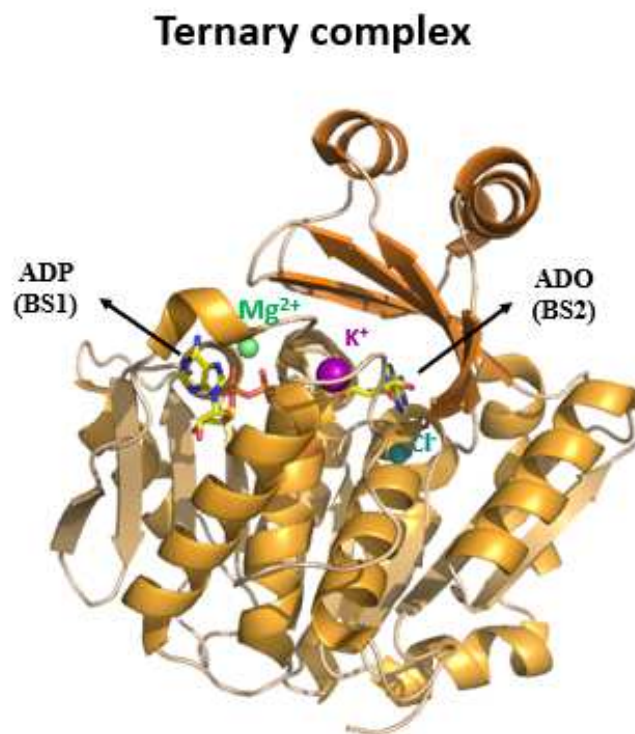
SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Figure s1

a



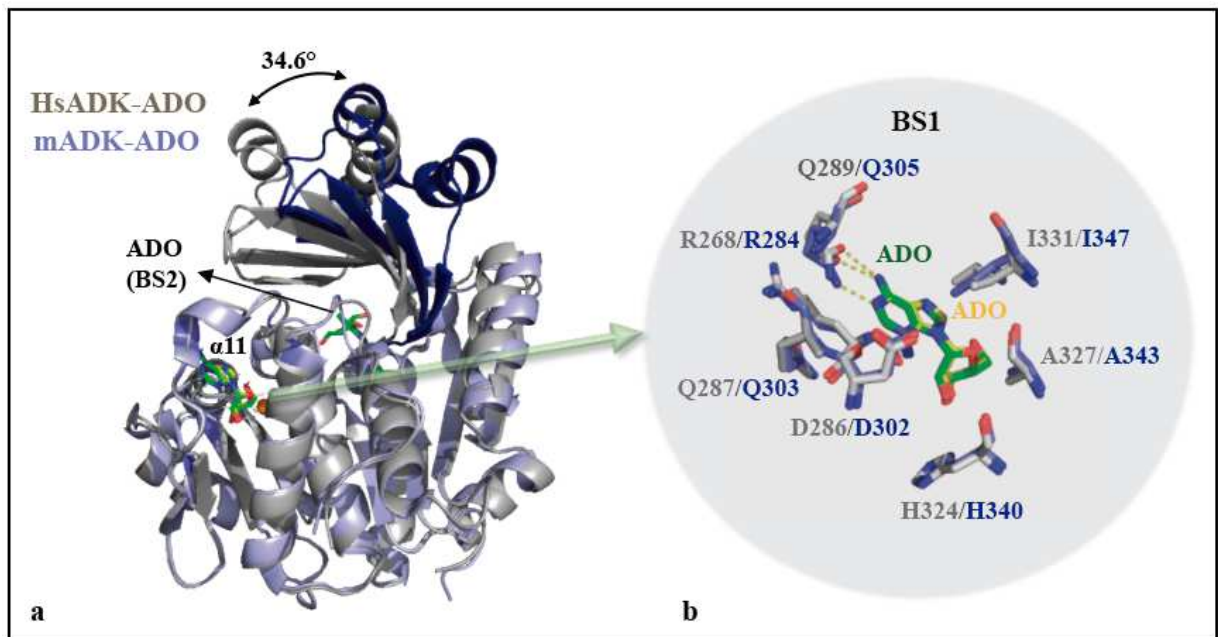
b



Supplementary Figure S1. (a) Structures of mADK in complex with adenosine and **(b)** mADK in complex with adenosine and ADP. The mADK is a monomer formed by two unequally sized

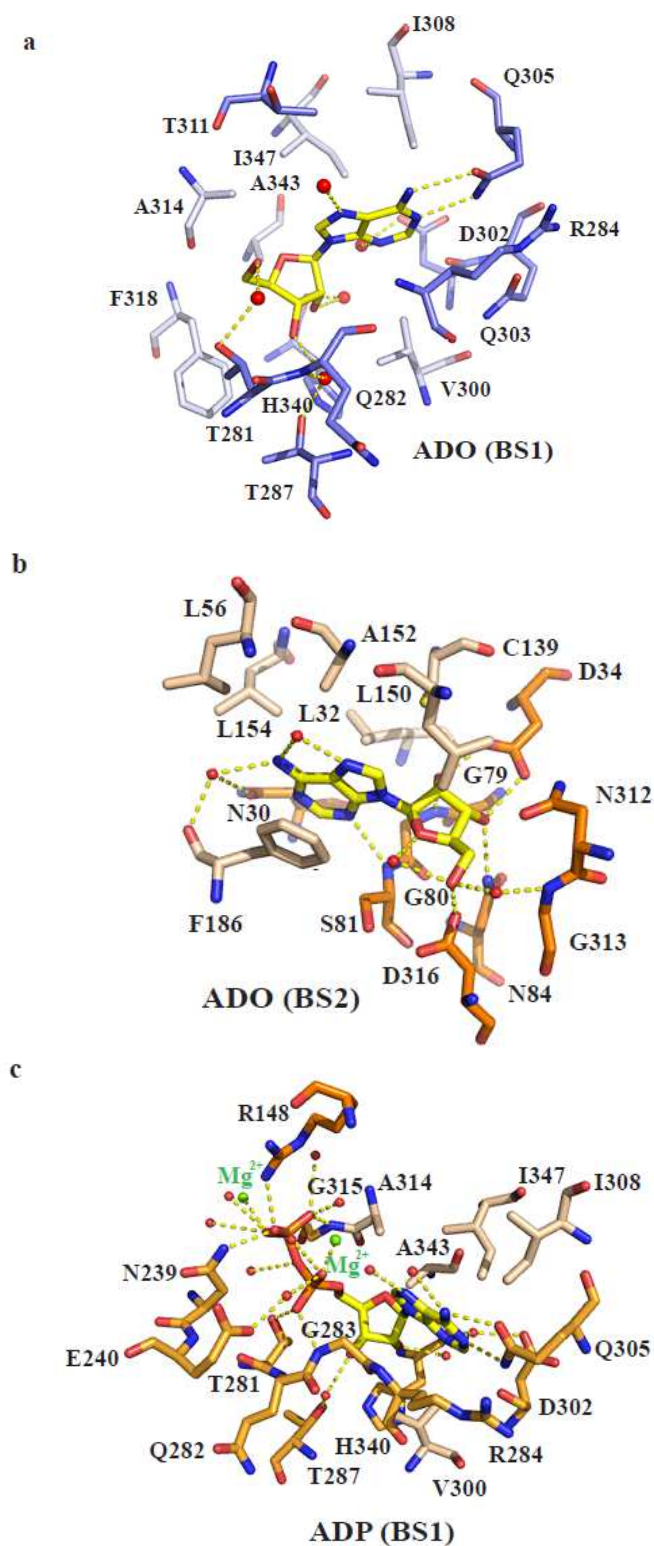
domains (i.e., a large three-layer ($\alpha\beta\alpha$) sandwich subdomain and a small lid α/β subdomain). The α -helices and β -sheets were numbered sequentially from $\alpha 1$ to $\alpha 13$ and $\beta 1$ to $\beta 14$ according to HsADK⁽⁸²⁾. ADO and ADP are shown as sticks with carbon, oxygen, nitrogen and phosphorus atoms colored in yellow, red, blue and orange, respectively. Spheres represent magnesium (green), chloride (pale cyan) and potassium (purple) ions. The mADK active sites are highlighted as BS1 (nucleotide site) and BS2 (nucleoside site), both located in a cavity of the large domain.

Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S2. (a) Superposition of the mADK binary complex (PDB code:5KB6 shown in blue) and HsADK binary complex (PDB code: 1BX4 shown in grey) (RMSD overall 3.14Å, Lid domain 9.74Å and large domain 0.77Å). The figure shows the occupancy of BS1 of both mADK and HsADK by ADO. The mADK structure presented an additional α helix ($\alpha 11$) instead of a loop that appears in the HsADK. (b) Stereo view of the BS1 showing that ADO occupies a similar pocket in both mADK and HsADK structures. The residues were colored in gray and blue to HsADK and mADK, respectively.

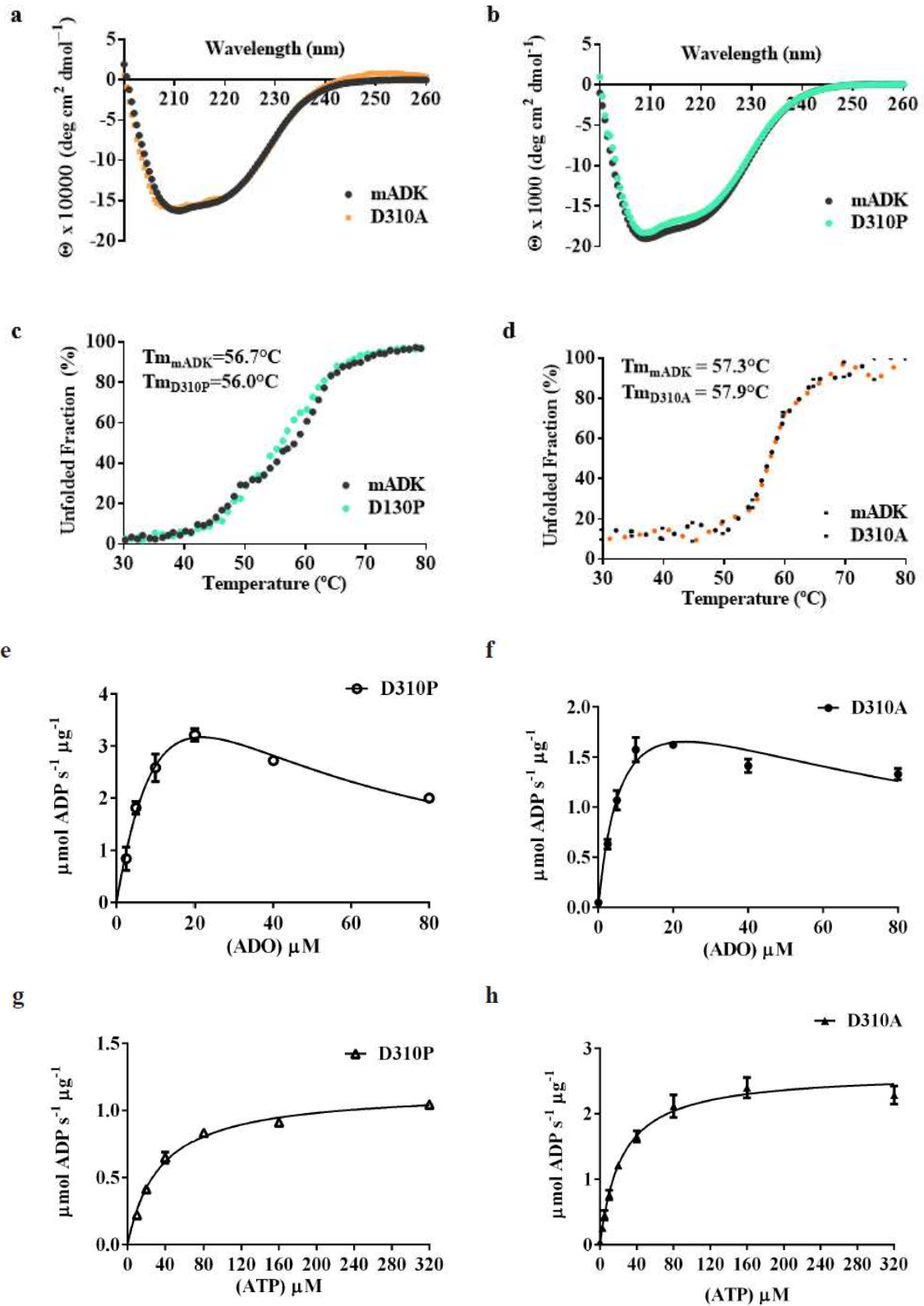
Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S3. (a) Stereo view of the BS1 interaction with ADO identified at the mADK binary complex. A large hydrophobic cluster (light blue residues) surrounds ADO together with five coordinated water molecules (red spheres). (b) Stereo view of the BS2

interactions with ADO at the ternary complex. In this structure, the ADO molecule was identified in the active nucleoside site (BS2). **(c)** Stereo view of the BS1 interactions with ADP in the ternary complex. ADP directly contacts with two magnesium ions, previously known as cofactors of mADK and large hydrogen bonding network formed by eleven water molecules which anchor the phosphate tail to the active configuration for catalysis. The β -phosphate directly contacts Arg148 (highlighted in dark orange sticks) present in the lid domain.

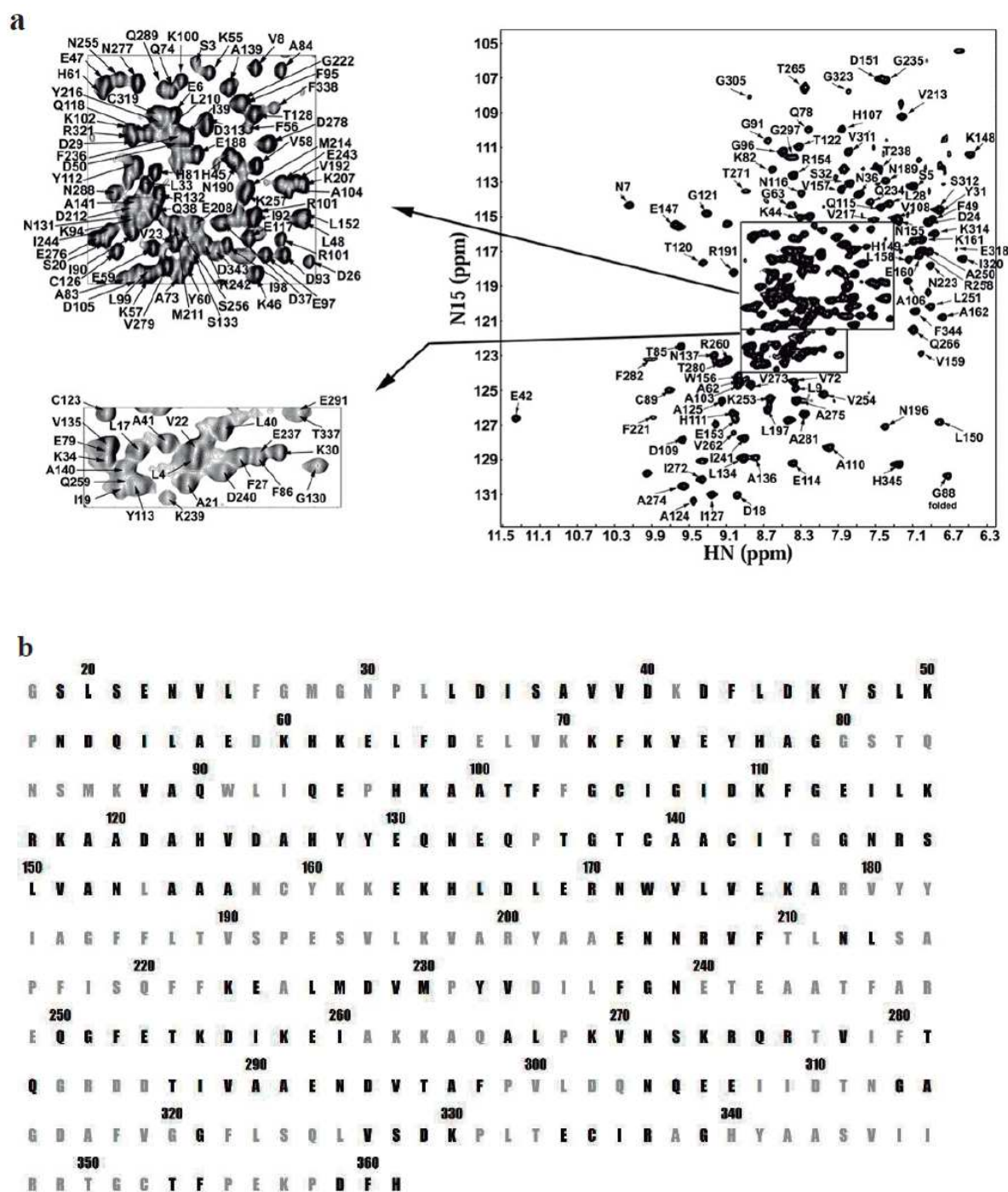
Supplementary Figure S4



Supplementary Figure S4. (a) Residual molar ellipticity measures of D310P mutant (cyan) and mADK wild-type (black) and (b) D310A mutant (orange) and mADK wild-type (black)

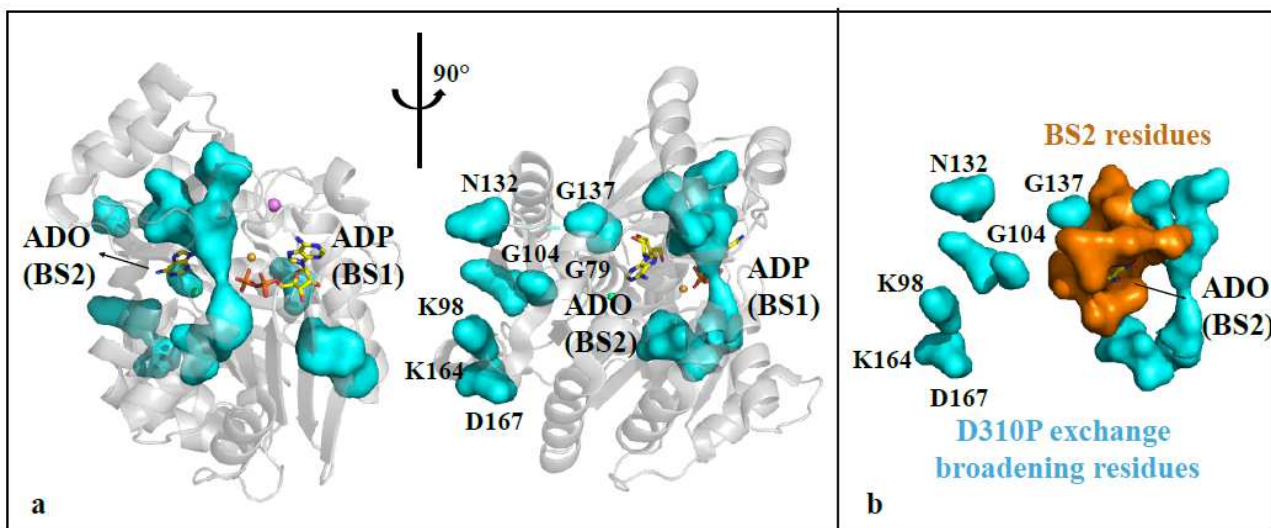
evaluated by circular dichroism at 200 to 260nm. The protein samples were at a 5 μ M in a 10 mM phosphate buffer, pH 7 and 10 mM NaCl. **(c)** Thermal stability curves of the D310P **(d)** and D310A measured by CD. The molar ellipticity was assessed at 222 nm in temperatures varying from 30 to 80 °C. The melting temperatures corresponding to each mutant are indicated in figure. **(e)** The D310P and **(f)** D310A *K_m* curve for ADO. The initial rate of the reaction was measured with 150nM enzyme (D310P or D310A), 50 μ M ATP and ADO concentration varying from 0 to 80 μ M. The kinetic parameters for ADO were obtained by substrate inhibition fitting model. **(g)** D310P and **(h)** D310A *K_m* curve for ATP. The initial rate of the reaction was measured using 150nM of each mutant (D310P or D310A), 50 μ M ADO and ATP concentration varying from 0 to 320 μ M. For the ATP substrate, the mutants exhibited characteristic Michaelis Menten Kinetic. Kinetic constants for both ADO and ATP substrates are shown in the Supplementary Table 1.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure S5. (a) TROSY ^{15}N - ^1H HSQC spectrum of U- ^{15}N , ^{13}C , 2 -labeled mADK recorded at 298K. Two regions of the spectrum are enlarged, and peaks are labeled with residue numbers. (b) Multiples stretches of the mADK residues sequence. Residues in gray were those that were not found in NMR assays by the ^{15}N - ^1H HSQC protocol saturation of mADK by the γATP .

Supplementary Figure S6



Supplementary Figure S6. (a) Stereo view of the mADK structure (gray; PDB:5KB5). Highlighted in cyan are shown the signals of residues that are broadened in the D310P mutant in comparison with the wild-type mADK after ATP γ S titration by 2D ^{15}N - ^1H HSQC. The rotated structure pose (90°) shows the location of the additional residues of D310P mutant that are also broadened after the ATP γ S titration, which are shown to be located in regions that are distinct from the BS2. (b) The residues that compose the BS2 are shown in orange and they are not affected during the ATP γ S titration.

Supplementary Table 1. mADK kinetic parameters

	^a ADO			^b ATP		
	WT	D310P	D310A	WT	D310P	D310A
V_{max} ($\mu\text{M ADP s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$)	12.79(± 1.20)	9.26(± 397)	2.59(± 0.27)	7.84(± 0.08)	1.15(± 0.06)	2.63(± 0.06)
K_m (μM)	2.30(± 0.38)	12.81(± 0.65)	7.63(± 1.39)	3.53(± 0.14)	33.03(± 2.28)	23.12(± 1.81)
K_{cat} (s^{-1})	0.53	0.09	0.1	0.33	0.05	0.10
K_{cat}/ K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	2.30×10^5	7.28×10^4	1.31×10^4	1.00×10^5	1.5×10^3	4.32×10^3

a- kinetic constants obtained by substrate inhibition fitting model. b- kinetic constants obtained by fitting the *Michaelis-Menten* equation. Results are expressed as mean $\pm$ SD of six independent experiments

Supplementary Table 2. mADK kinetic parameters for the substrate competition assay.

^a ATP kinetic constants				
ADO (μM)	5	10	20	40
V_{max} ($\mu\text{M ADP s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$)	7.03 (± 0.05)	10.25 (± 0.10)	16.17 (± 0.30)	12.49 (± 0.11)
K_m (μM)	0.74(± 0.06)	1.82(± 0.14)	6.99(± 0.73)	6.64(± 0.33)
R square	0,9856	0,9799	0,9746	0,9822

a- kinetic constants obtained by non-linear *Michaelis-Menten fitting*. The initial rate of reaction was obtained as a function of ATP and stepwise increases of ADO concentration. Measurements were obtained from 3 independent experiments. Results are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments

Supplementary Table 3. Kinetic parameters of mADK for ATP in the presence and absence of potassium

	100 mM KCl	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
^a ATP	-	2.42 (± 0.13)	0.004	0.25	1.03×10^5
	+	2.10 (± 0.12)	0.007	0.46	2.19×10^5

a- kinetic constants obtained by non-linear *Michaelis-Menten fitting*. Results are expressed as mean $\pm$ SD of six independent experiments.

5. RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 Clonagem, expressão e purificação da mADK e mADK Δ 19

Tanto a proteína selvagem mADK quanto a variante truncada mADK Δ 19 foram clonadas com sucesso no vetor pET28a(+)-sumo e expressas em *E.coli* BL21(DE3). O teste de expressão revelou ótimas condições para a produção das proteínas após indução com 0,5 mM de IPTG, a 22°C pelo período de 16h. Análise em gel de poliacrilamida mostrou que as duas construções, pET28a(+)-sumo_mADK e pET28a(+)-sumo_mADK Δ 19 foram expressas na fração solúvel, ligaram majoritariamente na coluna de níquel e apresentaram massas moleculares coerentes para os tamanhos esperados, de 54,7 e 52,7 kDa, respectivamente (Figuras 12 e 13A). As etapas de lavagem foram eficientes para eliminar maior parte dos contaminantes e as proteínas foram eluídas na presença de gradiente linear de imidazol de 0 a 500 mM. A mADK eluiu com aproximadamente 60 mM de imidazol e a mADK Δ 19 com 100 mM. Ambas apresentaram elevado grau de pureza após a primeira etapa de purificação.

As frações eluídas da cromatografia de afinidade foram unidas e submetidas a uma etapa de diálise para simultaneamente remover o imidazol e realizar-se a proteólise com Ulp1, liberação das caudas de fusão de 6-histidinas (Figuras 12 e 13 B). Após a diálise, a fração proteica, já sem a cauda de fusão, foi submetida novamente a uma etapa de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Dessa etapa de purificação, coletaram-se as frações referente ao *flow-through* (fração não adsorvida) e as frações eluídas após gradiente linear de imidazol foram descartadas, pois tratavam-se da protease Ulp1 e cauda de fusão de 6 histidinas que ficaram adsorvidas na coluna. As frações referentes as proteínas mADK e mADK Δ 19 clivadas, foram concentradas e submetidas a cromatografia de exclusão de tamanho (Figura 12 e 13C).

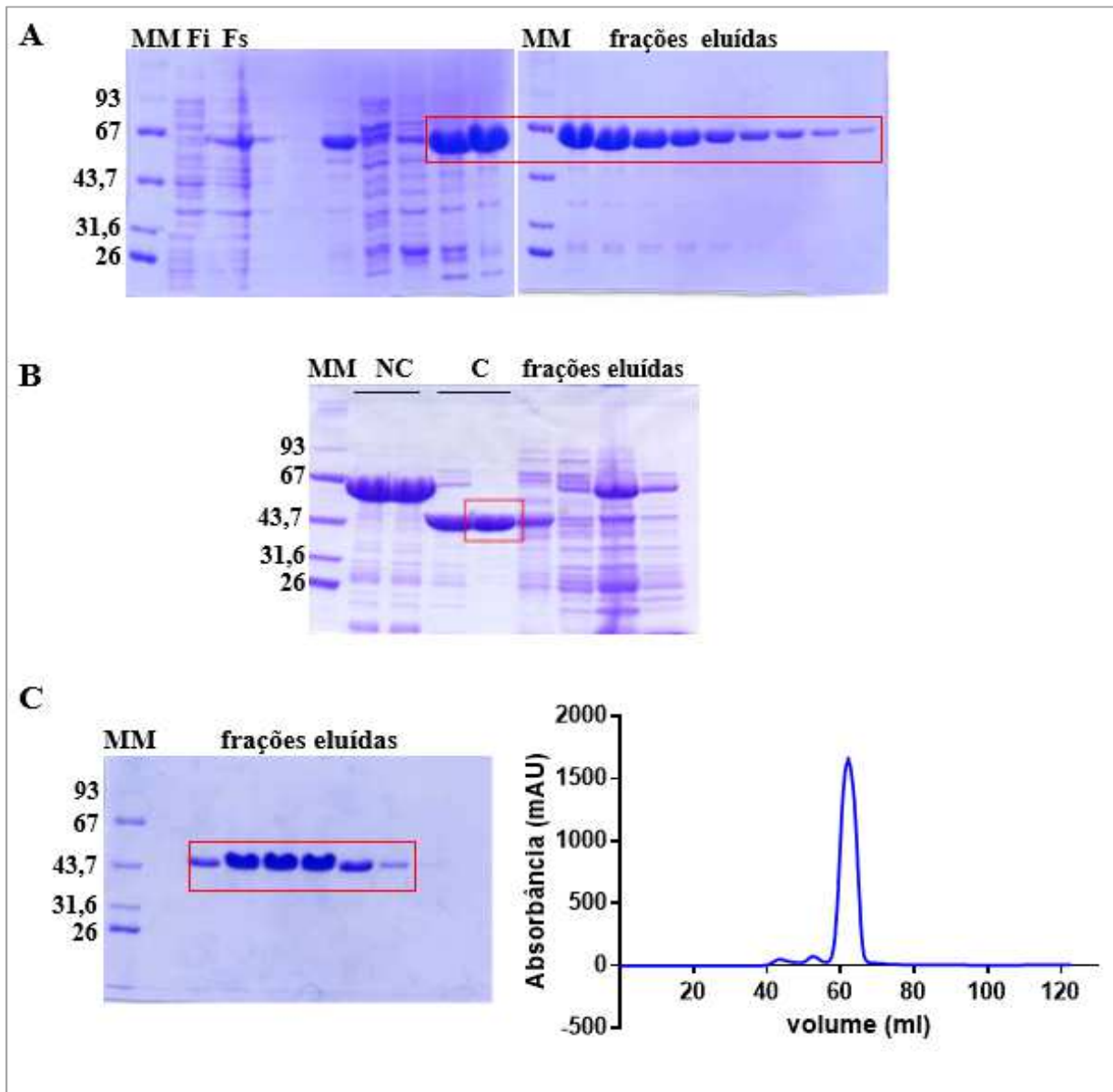


Figura 12. Geis de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das etapas de purificação e obtenção da mADK. **(A)** purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap HP (GE). Marcador de peso molecular (MM)(kDa), fração insolúvel (Fi) e fração solúvel (Fs) após a lise celular, e em destaque na caixa vermelha estão as frações correspondentes a etapa de eluição após gradiente linear de Imidazol (mADK ~ 54,7 kDa). **(B)** purificação por cromatografia de afinidade após a clivagem da cauda de fusão com Ulp1 protease. Marcador de peso molecular (MM)(kDa), frações proteicas não clivadas (NC), frações proteicas clivadas (C) obtidas na fração não adsorvida (*Flow-through*) (mADK ~ 40,2 kDa). Por fim as frações eluídas com 500 mM de imidazol. **(C)** cromatografia por exclusão molecular em coluna *Hiload Superdex 75 16/600* (GE *Healthcare*). MM – marcador de peso molecular (kDa) e frações eluídas.

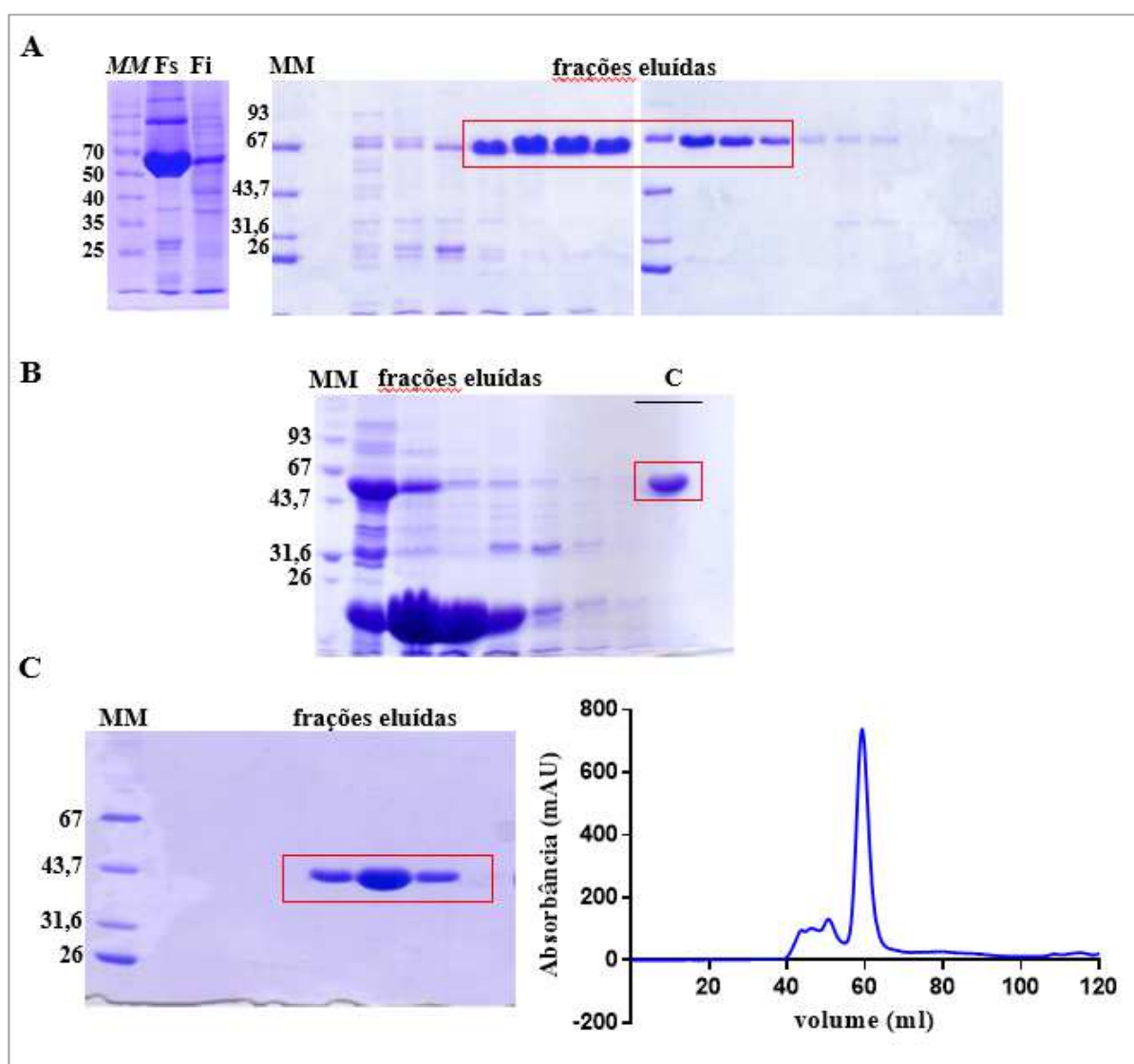


Figura 13. Geis de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) das etapas de purificação e obtenção da mADK Δ 19. (A) fração solúvel (Fs), fração insolúvel (Fi) após a lise celular e purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap HP (GE). Marcadores de peso molecular (MM- Pageruler *Thermo scientific*) e (MM)(kDa) e em destaque dentro da caixa vermelha estão as frações correspondentes a eluição com gradiente linear de Imidazol (mADK ~ 54,7 kDa). (B) etapa de purificação por cromatografia de afinidade após a clivagem da cauda de fusão com Ulp1 protease. A figura apresenta: marcador de peso molecular (MM)(kDa) utilizado, frações eluídas após 500 mM de imidazol e a fração proteica (C) já clivadas e obtida na fração não adsorvida (*Flow-through*) na coluna de níquel (mADK ~ 40,2 kDa). (C) cromatografia por exclusão molecular em coluna *Hiload Superdex 75 16/600* (GE *Healthcare*). O gel mostra: MM – marcador de peso molecular (kDa) e frações coletadas referentes ao pico de maior intensidade do cromatograma.

As proteínas obtidas após a última etapa de purificação foram concentradas, quantificadas por absorbância a 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar teórico de $25900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado considerando todas as cisteínas reduzidas.

5.2 Mutagênese sítio dirigida da mADK

Com o objetivo de investigar o papel dos resíduos de aminoácidos críticos para a coordenação do íon potássio e sua função estrutural na regulação da atividade da mADK, foram realizadas mutações sítio dirigidas do resíduo Asp310 na isoforma longa da mADK. Optou-se pela geração de dois mutantes, o primeiro teve o resíduo Asp310 substituído por uma prolina (D310P) e o segundo por uma alanina (D310A). As mutações foram desenhadas para avaliar além de possíveis alterações estruturais no sítio, modificações na estabilidade e esfera de coordenação do íon. Os mutantes foram gerados por mutagênese sítio dirigida a partir de amplificação via PCR utilizando como DNA molde o vetor de expressão da enzima mADK selvagem. As mutações foram confirmadas por reação de sequenciamento de DNA (Figura 14).

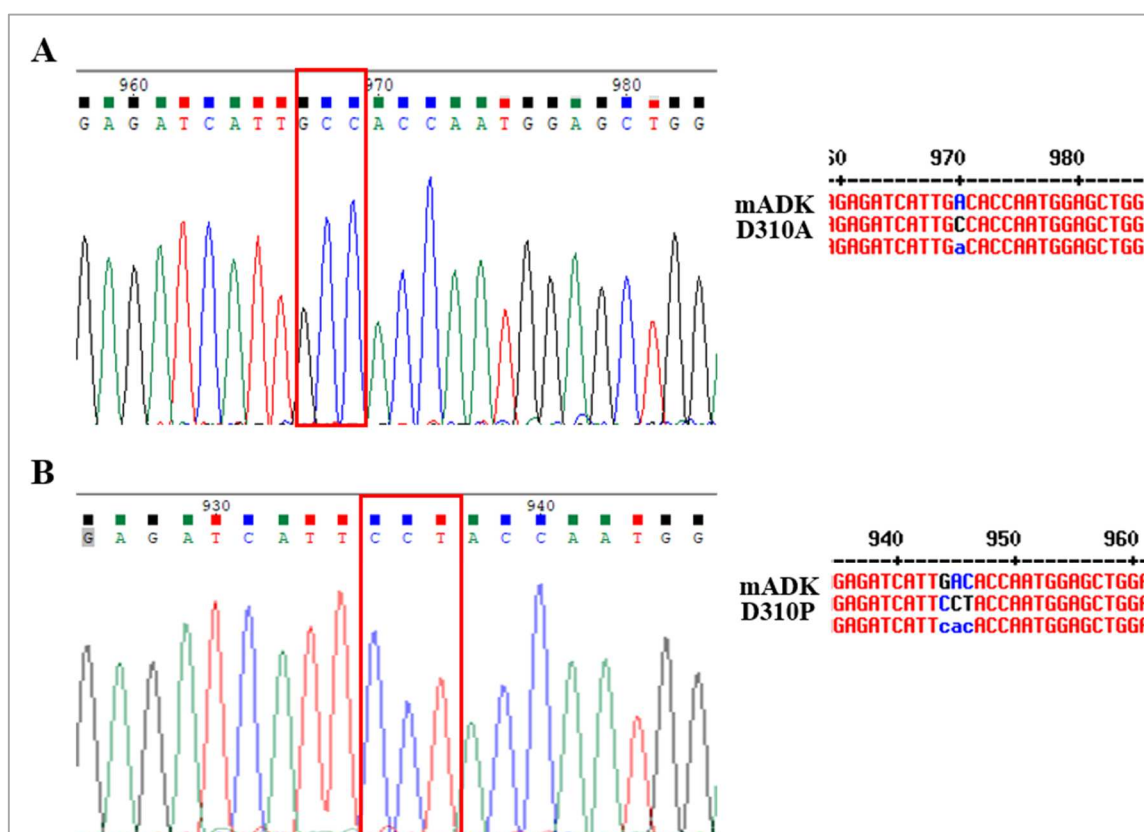


Figura 14. Confirmação da mutagênese sítio-dirigida por sequenciamento de DNA. (A) parte do cromatograma obtido após sequenciamento do mutante D310A. A direita, o alinhamento de sequência referente a enzima selvagem e do mutante D310A, confirmando a ocorrência da mutação GAC para GCC. (B) parte do cromatograma obtido após sequenciamento do mutante D310P. A direita, o alinhamento das sequências da mADK selvagem e do mutante D310P, confirmando a ocorrência da mutação GAC por CCT. Utilizou-se para a reação de sequenciamento o oligo antisense utilizado na clonagem da enzima selvagem.

Após a confirmação da presença das mutações por reação de sequenciamento, os plasmídeos foram transformados em linhagem de *E.coli* BL21(DE3). As enzimas mutadas foram expressas e purificadas, seguindo protocolos estabelecidos previamente para a obtenção da enzima selvagem.

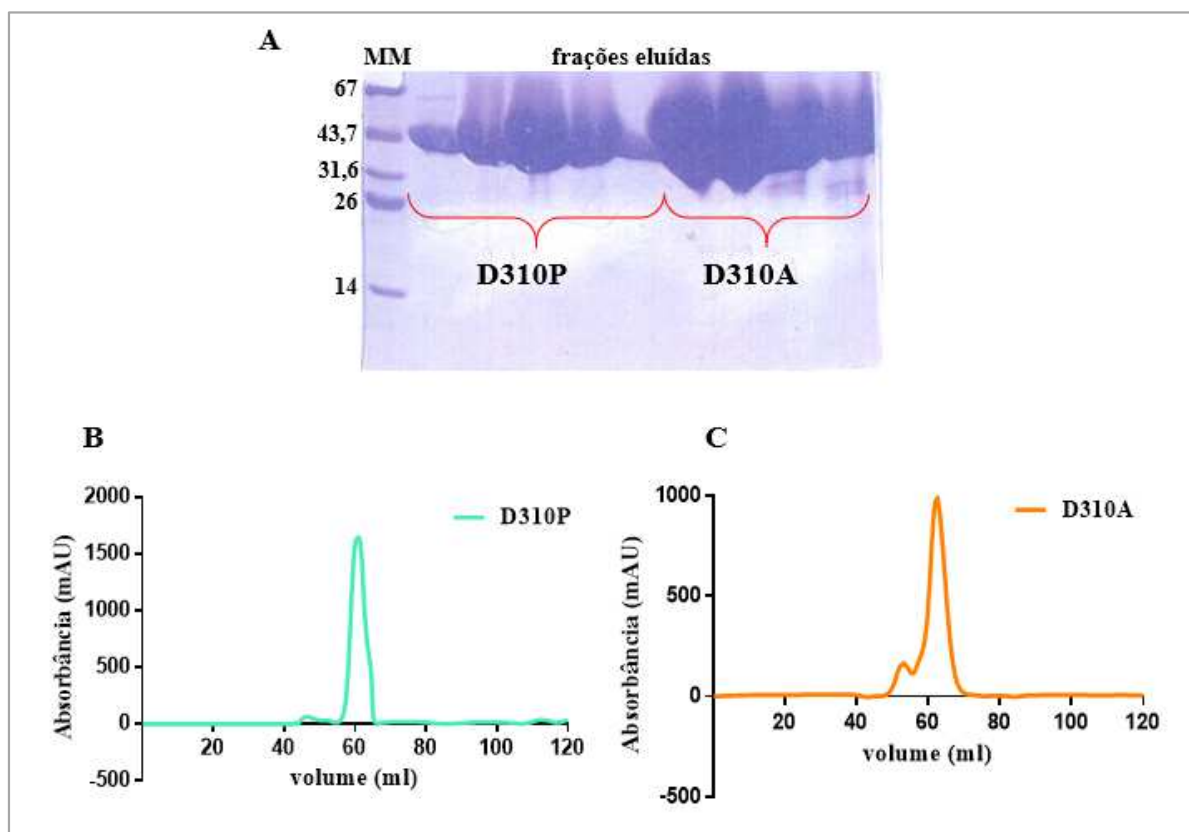


Figura 15. Gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) referente a etapa de cromatografia por exclusão de tamanho dos mutantes D310P e D310A. As purificações foram realizadas em coluna *Hiload superdex 75 16/600* (GE) em sistema AKTA-FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography* – GE). As amostras presentes no gel são: marcador de peso molecular (MM – kDa) e as frações coletadas para cada proteína mutante D310P e D310A. (B) e (C) Perfis cromatográficos obtidos na purificação por exclusão de tamanho para o mutante D310P e D310A, respectivamente.

5.3 Caracterização estrutural das proteínas recombinantes por Dicroísmo circular (CD) e Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A homogeneidade estrutural das amostras foi analisada com intuito de inferir o estado oligomérico das proteínas expressas e a adequabilidade para estudos biofísicos e estruturais. As análises de DLS indicaram baixa polidispersidade ($< 20\%$) e raios hidrodinâmicos em torno de 3 nm (Figura 16), valor esperado para o tamanho hidrodinâmico da mADK. Esses resultados mostraram que tanto a mADK quanto a mADK Δ 19, se comportam como monômeros em solução e estão em conformidade aos requerimentos para análises espectroscópicas e ensaios de cristalização.

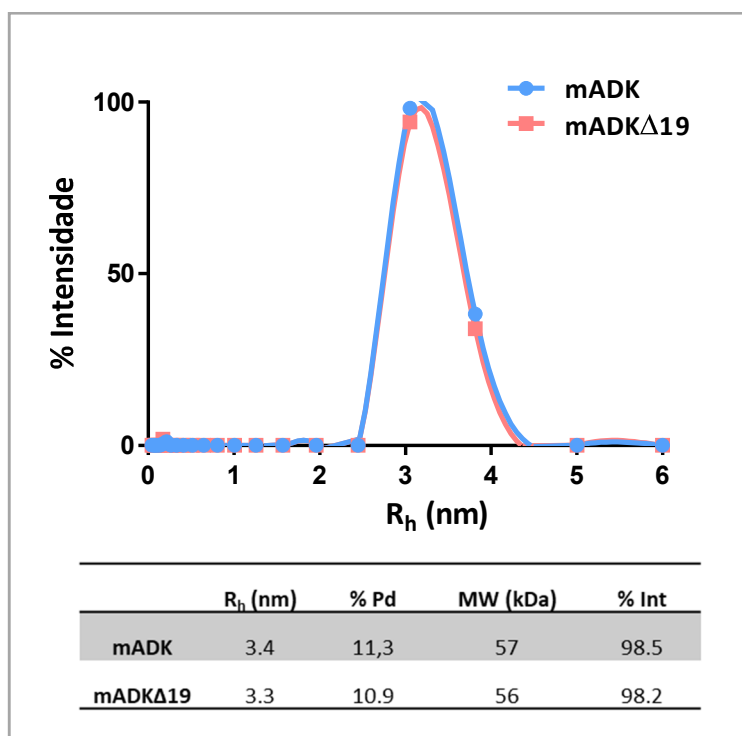


Figura 16. Distribuição de tamanho por DLS das proteínas recombinantes mADK e mADK Δ 19. Gráfico da intensidade de espalhamento de luz (%) em função do raio hidrodinâmico médio estimado (nm). A tabela da figura apresenta os valores obtidos para o raio hidrodinâmico (R_h)(nm), polidispersidade (Pd%), massa molecular (Mw- kDa) e a porcentagem de espalhamento de luz de cada partícula em solução (% Int), respectivamente para as enzimas estudadas mADK e mADK Δ 19.

Espectros obtidos por espectroscopia de dicroísmo circular no UV distante para mADK e mADK Δ 19 apresentaram composição mista de elementos estruturais, predominantemente hélices- α e folhas- β , compatível com o enovelamento da mADK e equivalente as características dos domínios que a compõem (Figura 17^a). Além de confirmar a elevada quantidade de estrutura secundária, esses resultados sugerem que as proteínas recombinantes conservam suas estruturas nativas em solução. Sabendo-se quais os elementos presentes de estruturas secundárias presentes, utilizou-se o comprimento de onda de 222 nm para avaliar a estabilidade térmica das enzimas, diante do aumento de temperatura (Figura 17B). Os dados revelaram que tanto a mADK quanto a mADK Δ 19 apresentam apenas um estado de transição e a deleção de 19 resíduos na região N-terminal, para geração da variante mADK Δ 19, não acarretou instabilidade da proteína em comparação a enzima selvagem.

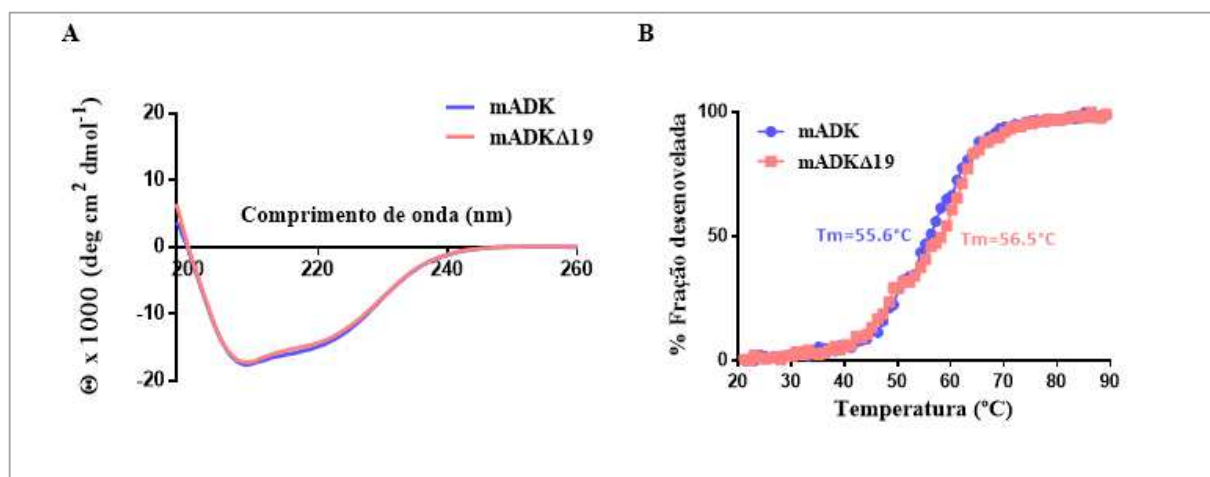


Figura 17. (A) Espectros de CD no UV distante das proteínas mADK e mADK Δ 19. O espectro apresenta perfil da elipticidade molar (Θ em função do comprimento de onda no UV distante (200 a 260 nm). Na figura estão evidentes mínimos negativos em 222 nm e 208 nm, característicos de proteínas com predominância de estrutura secundária de hélices- α e folhas- β . (B) Perfis de desenovelamento térmico das proteínas mADK e mADK Δ 19 avaliados por CD. As curvas foram obtidas medindo-se a elipticidade molar a 222 nm (Θ_{222}) em função do aumento da temperatura (20 a 90°C). O gráfico expressa porcentagem de fração desenovelada, obtida a partir do cálculo da fração enovelada através da equação: $\alpha = (\Theta_t - \Theta_U) / (\Theta_F - \Theta_U)$, na qual Θ_t é a elipticidade molar medida a qualquer temperatura, Θ_F elipticidade molar na forma totalmente enovelada, Θ_U elipticidade molar na forma totalmente desenovelada (118). A temperaturas de transição entre os estados, T_m (*melting temperature*), está destacada na figura nas cores azul, $T_m=55.6^\circ\text{C}$ para mADK, e na cor rosa $T_m=56.5^\circ\text{C}$ para mADK Δ 19.

5.4 Caracterização estrutural dos mutantes por Dicroísmo circular (CD) e Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A integridade e homogeneidade estrutural dos mutantes, D310P e D310A, foram avaliados por CD e DLS. Os espectros de CD mostraram elevado conteúdo de estrutura secundária, composta por hélices- α e folhas- β , semelhante ao padrão estrutural obtido para enzima selvagem, mADK (Figuras 18A e B). Portanto, as mutações pontuais não alteraram estruturalmente a enzima, conservando o enovelamento, conteúdo de estrutura secundária e características nativas em solução. A estabilidade térmica dos mutantes, D310P e D310A, foram avaliadas por CD. As curvas de desnaturação térmica (Figuras 18C e D), revelaram que os mutantes conservam as transições únicas de estado e estabilidade térmica análoga a da enzima selvagem. Completando as análises estruturais e de homogeneidade dos mutantes, curvas de espalhamento dinâmico de luz realizadas para os mutantes, corroboraram com os estudos de CD, confirmando que as enzimas mutantes se comportam de forma homogênea e monoméricas em solução (Figuras 18E), viabilizando assim a realização de ensaios funcionais e estruturais.

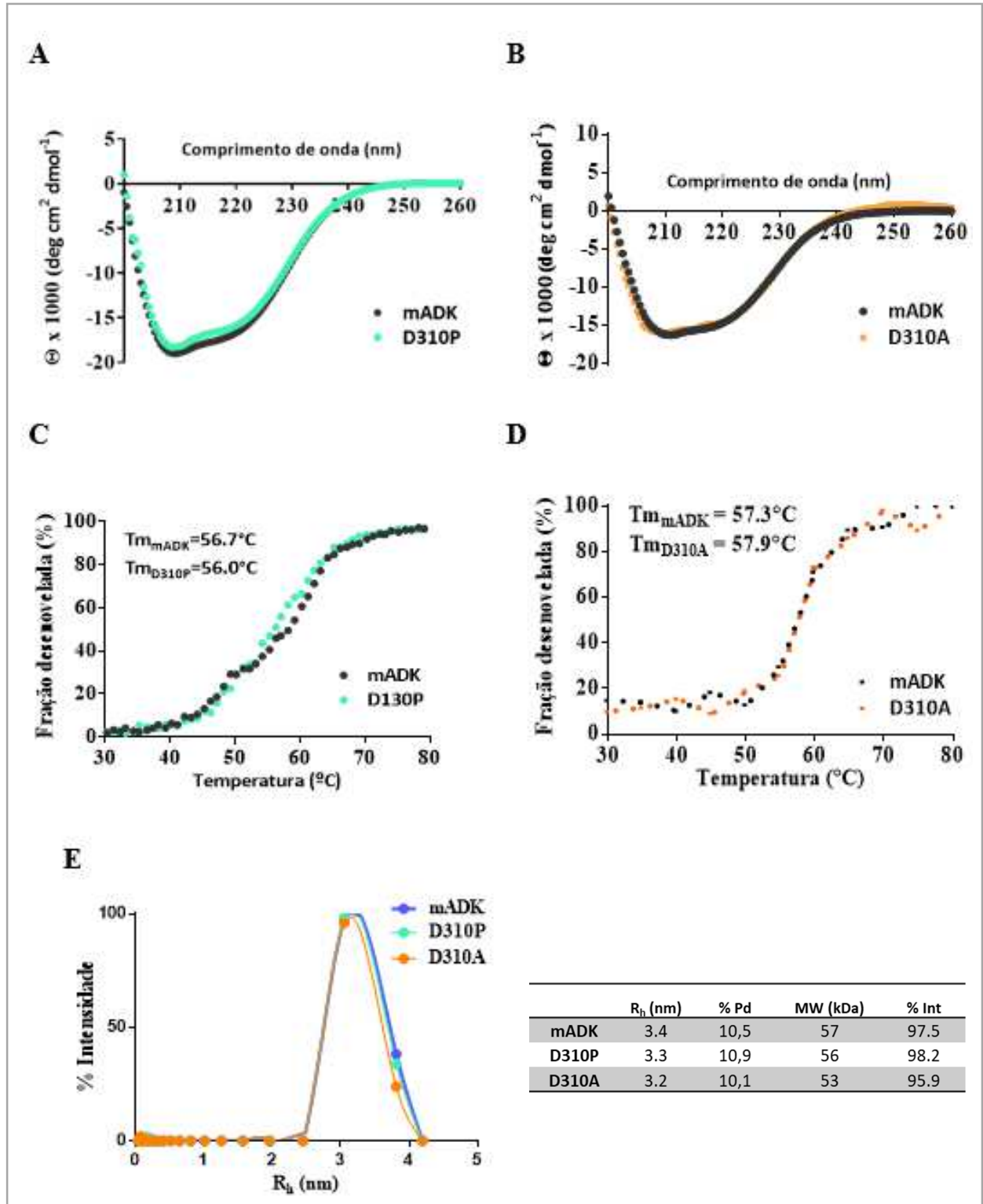


Figura 18. Espectros de CD no UV distante dos mutantes D310P (**A**) e D310A (**B**) em comparação com a enzima selvagem mADK (espectros na cor preto). Os experimentos foram realizados com as proteínas na concentração de 10 μM . Perfis de desenovelamento térmico do mutante D310P (**C**) e D310A (**D**), em comparação com o perfil medido para a enzima selvagem. As curvas foram obtidas medindo-se a elipticidade molar a 222nm (Θ_{222}) em função do aumento da temperatura (30 a 90°C). A temperatura de transição entre os estados (T_m), obtida para cada mutante está descrita na figura em comparação ao valor obtido para a enzima selvagem. (**E**) Perfis de distribuição de tamanho analisados por DLS para os mutantes D310P

e D310A, em comparação com a enzima selvagem. As curvas apresentam a porcentagem de intensidade de espalhamento de luz em função do raio hidrodinâmico médio estimado. A tabela da figura apresenta os valores obtidos de raio hidrodinâmico (R_h)(nm), porcentagem de polidispersidade (%), massa molecular (kDa) e a porcentagem de espalhamento de luz para cada proteína em solução.

5.5 Cristalização da mADK na presença de ADO, coleta de dados e processamento

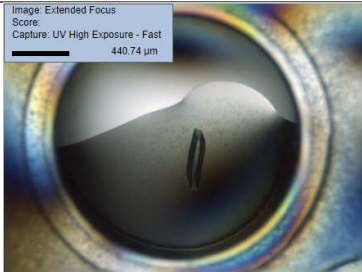
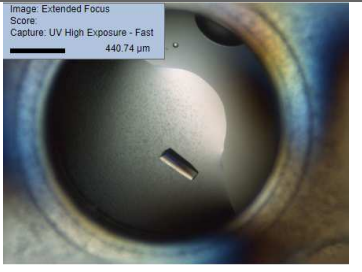
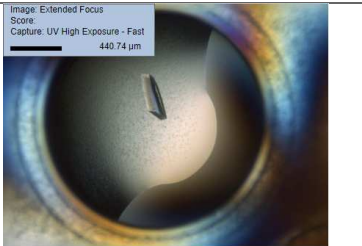
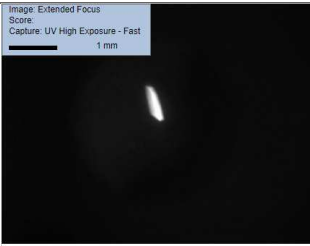
Após 4 dias de incubação da proteína mADK na presença de 2.5 mM de ADO, o primeiro cristal foi obtido da amostra de 18mg/ml (Figura 19). As condições de cristalização foram: 0,1 M de Acetato de sódio pH 4,5, 0,2 M Sulfato de Lítio e 50% PEG 400. Não ocorreram formação de cristais nas outras condições submetidas aos ensaios de cristalização.



Figura 19 – (A) Cristal da proteína mADK obtido na presença de ADO nas condições: 0,1 M de Acetato de sódio pH 4,5, 0,2 M Sulfato de Lítio e 50% PEG 400. A foto foi adquirida pelo Robô automatizado de visualização *Rock Imager 1000* (Formulatrix) e a esquerda está a escala de 271.47 μM. (B) foto do cristal por iluminação UV. A escala é de 643.32 μM.

Realizou-se uma etapa de refinamento dessa condição inicial obtida para a mADK na presença de ADO. Após a otimização e refinamento, cristais com morfologias mais adequadas foram obtidos (tabela 5). O melhor conjunto de dados foi coletado do cristal oriundo da condição de refinamento 0,1 M de Acetato de sódio pH 4,5, 0,2 M Sulfato de Lítio e 49% PEG 400.

Tabela 5: Cristais de mADK na presença de ADO otimizados após refinamento da condição inicial de cristalização

Imagem do Robô de Visualização	Imagem com UV	Condição de cristalização
		0,1 M de Acetato de sódio pH 4,5, 0,2 M Sulfato de Lítio 49% PEG 400
		0,1 M de Acetato de sódio pH 4,5, 0,2 M Sulfato de Lítio 48% PEG 400
		0,1 M de Acetato de sódio pH 4,5, 0,2 M Sulfato de Lítio 47% PEG 400

Os dados coletados tiveram resolução máxima de 1,2 Å. As reflexões foram indexadas no sistema cristalino monoclinico, com os parâmetros de cela unitária $a = 50.84$ Å, $b = 82.16$ Å, $c = 89.19$; $\alpha = \gamma = 90$ Å e $\beta = 92.69$ Å, pertencente ao grupo espacial $P 1 2_1 1$ e duas moléculas na unidade assimétrica. As estatísticas estão descritas na tabela abaixo. (Tabela 6).

Tabela 6. Estatística de coleta e processamento de dados para o cristal da mADK na presença de ADO.

Parâmetros	Resultados
<i>Dados da coleta</i>	
Grupo espacial	P 1 2 ₁ 1
Parâmetros da cela unitária (Å, °)	a=50,84, b=82,16, c=89,19 $\alpha = \gamma = 90$, $\beta = 92.7$
Resolução (Å)	50,00 – 1,20
Multiplicidade	4,0 (3,8)
Completeza (%)	99,7 (99,9)
R _{merge} (%)	0,054 (0,653)
I/ σ (I)	22,9
<i>Refinamento</i>	
Resolução (Å)	20,76 – 1,20 (1,23-1,20)
Reflexões únicas	216557
R _{work} /R _{free}	0,141/ 0,159
Número de átomos	5390
Ligante/íon	2 ADO, 2 Cl ⁻ , 3 PG4, 2 SO ₄ ²⁻ e 2 ACT
Moléculas na unidade assimétrica	2
Moléculas de H ₂ O	481
Média do fator B	20,01
RMSD do comprimento das ligações (Å)	0,010
RMSD dos ângulos de ligações (°)	1,39
<i>Ramachandran</i>	
Região favorável (%)	97,6
Regiões permitidas (%)	2,4
Outras regiões	0

Estatística para *highest-resolution shell* estão mostradas entre parênteses.

5.6 Cristalização da mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP, coleta de dados e processamento

Após várias tentativas de cristalização da mADK na presença de ADP ou ATP, 1 cristal da proteína mADK Δ 19 na presença de 2.5 mM ADO e 2.5 mM ADP foi obtido após 7 dias (Figura 20), na condição 0,15M de fosfato de sódio-dipotássio pH 6,5, 40% PEG 400 e 15% PEG 1000.

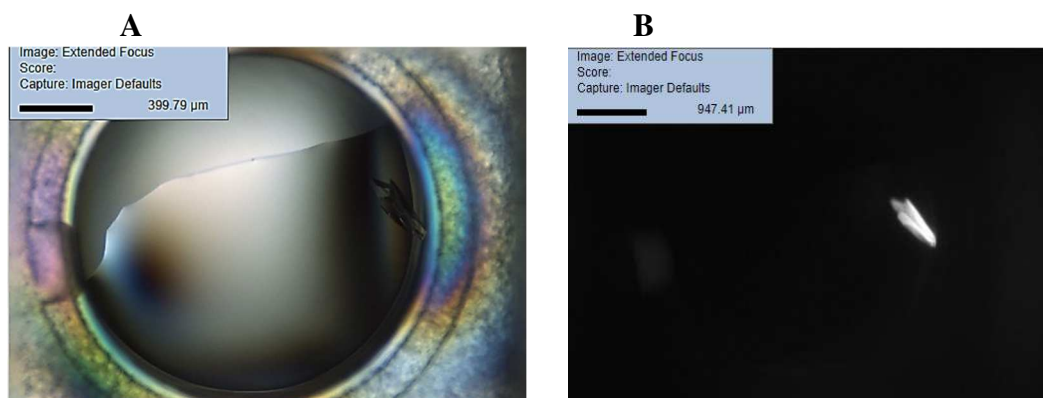
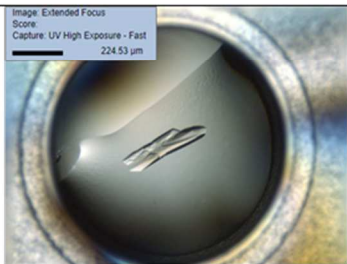
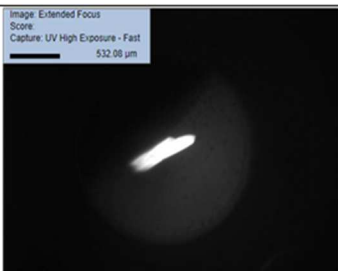
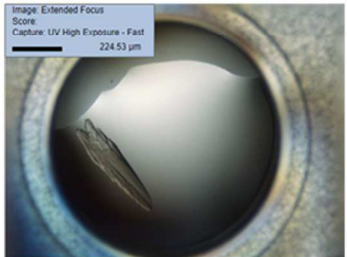
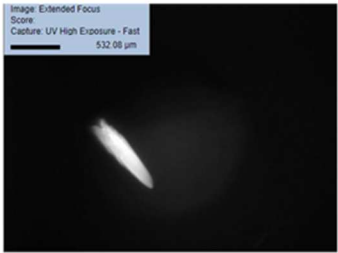
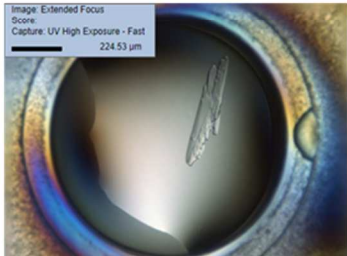
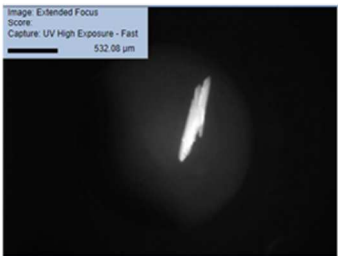


Figura 20- (A) Cristal da proteína mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP na condição 0,15M de fosfato de sódio-dipotássio pH 6,5, 40% PEG 400 e 15% PEG 1000. A foto do cristal foi adquirida pelo Robô automatizado de visualização *Rock Imager* 1000 (Formulatrix) e a escala da figura é 399.78 μM. (B) foto do cristal por iluminação UV na escala de 947.41 μM. A proteína mADK Δ 19 cristalizou a 18mg/ml na presença de 2.5 mM de ADO e 2,5 mM de ADP.

Esta condição inicial de cristalização foi refinada, e a otimização da condição inicial gerou o crescimento de novos cristais (Tabela 7), os quais foram submetidos a difração de raio X.

Tabela 7: Cristais de mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP otimizados após refinamento da condição inicial de cristalização.

Imagem do Robô de Visualização	Imagem com UV	Condição de cristalização
		0,15M de fosfato de sódio-dipotássio pH 6,5 40% PEG 400 15% PEG 1000
		0,15M de fosfato de sódio-dipotássio pH 6,5 40% PEG 400 14% PEG 1000
		0,15M de fosfato de sódio-dipotássio pH 6,5 40% PEG 400 12% PEG 1000

O melhor conjunto de dados foi coletado do cristal oriundo da condição: contendo fosfato de sódio-dipotássio pH 6,5, 40% PEG 400 e 12% PEG 1000. Os dados coletados tiveram resolução máxima de 1,8 Å. As reflexões foram indexadas no sistema cristalino ortorrômbico, com os parâmetros de cela unitária $a = 49.26$ Å; $b = 73.56$ Å; $c = 84.33$; $\alpha = \beta = \gamma = 90$ Å, pertencente ao grupo espacial $P 2_1 2_1 2_1$. As estatísticas estão descritas na tabela abaixo. (Tabela 8).

Tabela 8. Estatística de coleta e processamento de dados para o cristal da mADKΔ19 na presença de ADO e ADP.

Parâmetros	Resultados
Dados da coleta	
Grupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros da cela unitária (Å, °)	a=49,26 b=73,56 c=84,33 α=β=γ=90
Resolução (Å)	50,00 – 1,80 (1,86 - 1,80)*
Multiplicidade	4,2 (4,1)
Completeza (%)	98,8 (97,7)
R _{merge} (%)	0,093 (0,732)
I/σ (I)	12,8 (2,04)
Refinamento	
Resolução (Å)	24,63 – 1,8
Reflexões únicas	27048
R _{work} /R _{free}	0,165/ 0,199
Número de átomos	2679
Ligante/íon	1 ADO, 1 ADP, 1 K ⁺ , 1 CL ⁻ , 2 MG ²⁺ , 1 PG4, PO ₄ ³⁻
Moléculas na unidade assimétrica	1
Moléculas de H ₂ O	131
Média do fator B (Å ²)	24,26
RMSD do comprimento das ligações (Å)	0,018
RMSD dos ângulos de ligações (°)	1,85
Ramachandran	
Região favorável (%)	97,4
Regiões permitidas (%)	2,6
Outras regiões	0

Estatística para *highest-resolution shell* estão mostradas entre parênteses.

5.7 Determinação das estruturas dos complexos

As fases iniciais para o conjunto de dados referente a estrutura da mADK na presença de ADO, foram obtidas por substituição molecular, utilizando o programa MOLREP e empregando como molde a estrutura da adenosina quinase humana (PDB ID: 1BX4), que possui 90% de identidade de sequência com a enzima murina. A qualidade do mapa de densidade eletrônica está evidenciada no segmento que compreende os resíduos His123 a Tyr129, na figura 21A (Figura 21A). Uma molécula de ADO foi claramente definida, ligada ao sítio catalítico do nucleotídeo (BS1) e seu mapa de densidade eletrônica está mostrado na figura 21B.

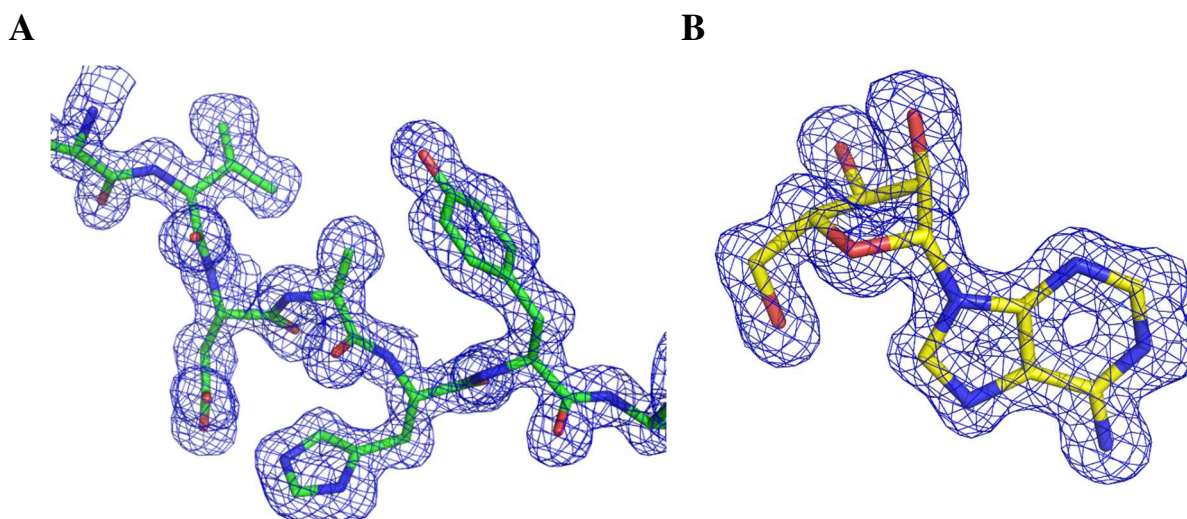


Figura 21 – (A) Porção representativa (resíduos His123 a Tyr129) do mapa final de densidade eletrônica 2Fo-Fc, a 1.2 Å de resolução com σ (nível de contorno) igual a 1. (B) mapa final de densidade eletrônica (2Fo-Fc) da molécula de ADO ligada ao BS1 (empregando-se σ igual a 1).

O modelo final compreende os resíduos 19 aos 361, 2 íons cloreto, 2 íons sulfatos, 2 íons acetatos e 481 moléculas de H₂O. As estatísticas do refinamento foram apresentadas na tabela 6.

A estrutura do complexo da proteína mADK Δ 19 na presença de ADO e ADP, foi refinada utilizando o conjunto de alta resolução obtido para a enzima selvagem mADK (PDB ID: 5KB6), na presença de adenosina. A qualidade do mapa de densidade eletrônica está mostrada na figura 22A. Uma molécula de ADO e uma molécula de ADP foram identificados na estrutura ocupando o sítio do nucleosídeo (BS2) e do nucleotídeo (BS1), respectivamente e

os seus mapas de densidade eletrônica estão apresentados na figura 22B e C). A estatística do refinamento e os parâmetros para esse modelo foram apresentadas na tabela 8.

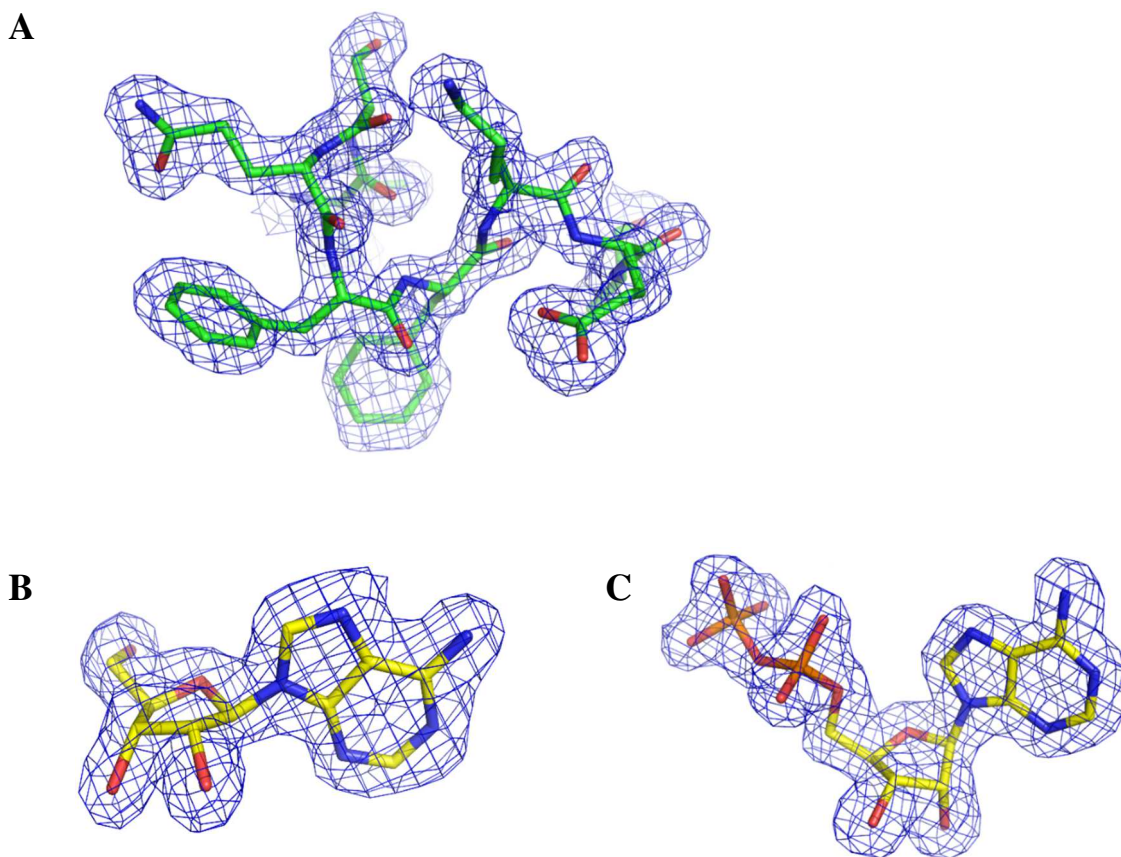


Figura 22 – (A) Porção representativa do mapa final da densidade eletrônica 2Fo-Fc (resíduos Iso218- Ala225), a 1.8 Å de resolução com σ igual a 1. (B) mapa final de densidade eletrônica 2Fo-Fc da molécula de ADO ligada ao BS2 e da molécula de ADP (C) ligada ao BS1 (empregou-se σ igual a 1).

5.8 Estrutura global da ADK murina

A análise do enovelamento da mADK mostrou que a enzima é composta de 14 folhas- β , 13 hélices- α e o restante da estrutura distribui-se em elementos do tipo β -hairpin, β -bulge, β -turn e γ -turn, como demonstrado no gráfico de topologia (Figura 23A). A estrutura global, assemelha-se a reportada anteriormente para a enzima humana (85), apresentando dois domínios distintos, sendo um maior de arranjo $\alpha/\beta/\alpha$ sanduiche e um menor de arranjo α/β , denominado de *lid*, como ilustrado na representação em fita do enovelamento global da mADK (figura 23B).

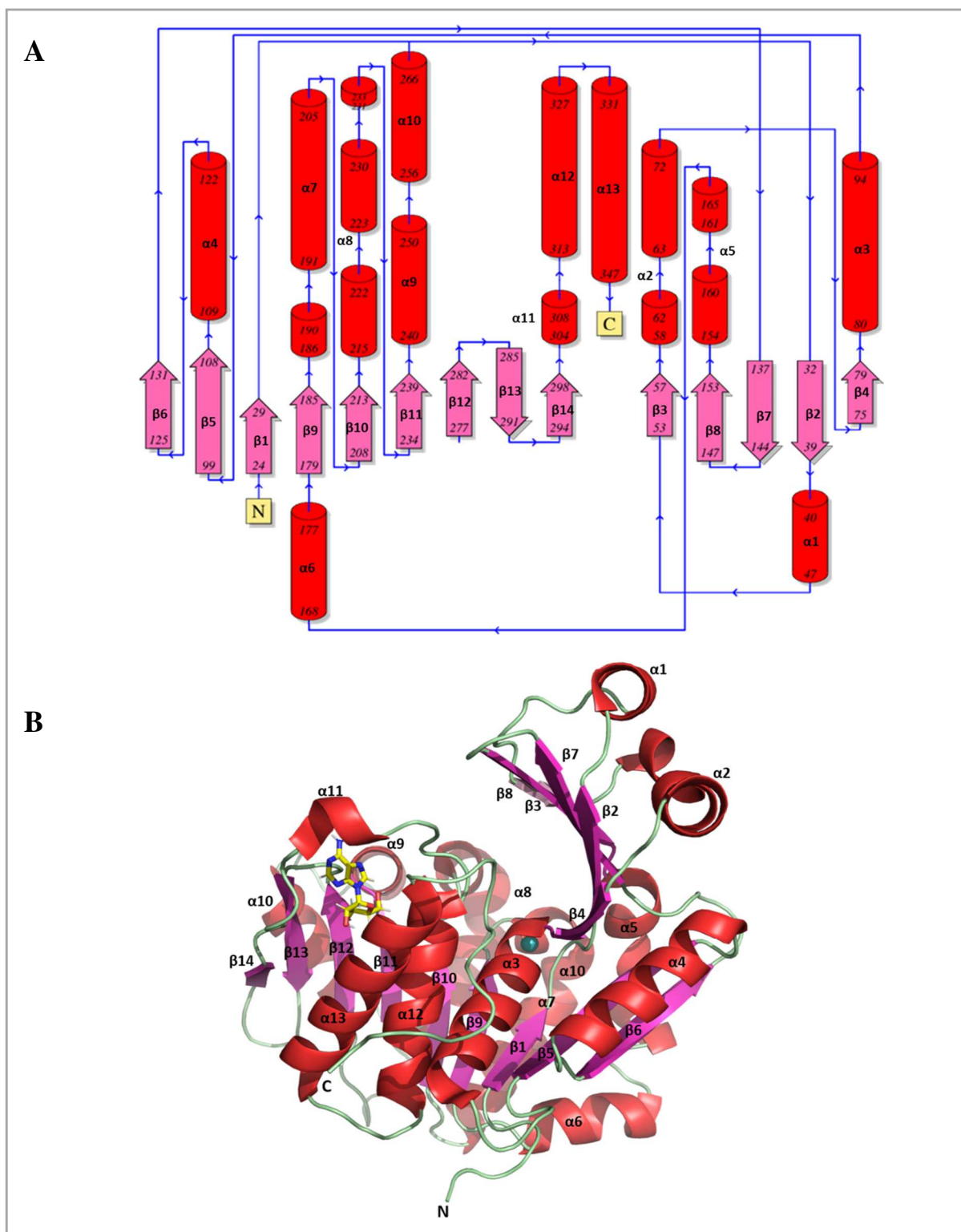


Figura 23- (A) Diagrama da topologia da mADK obtido pelo banco de dados PDBsum. (B) Representação em fita da mADK ligada a uma molécula de ADO. Na figura a molécula de ADO está mostrada em bastões amarelo e um íon Cl^- em esfera na cor ciano. As hélices estão numeradas de $\alpha 1$ a $\alpha 13$ (vermelho) e as folhas- β de $\beta 1$ a $\beta 14$. A estrutura apresenta uma molécula.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram a estrutura e os mecanismos estruturais envolvidos na ativação catalítica da ADK após a ligação de substratos. Além disso, nos resultados identificaram mecanismo de regulação alostérica da ADK pelo íon K^+ e sua potencial conexão com mecanismos homeostáticos de regulação do metabolismo de purinas pelo K^+ intracelular.

É digno de nota ressaltar que a resolução das estruturas de ADK de camundongos foram a segunda e terceira estruturas resolvidas dentre as ADKs de mamíferos, sucedendo uma única estrutura da ADK humana (PDB ID 1BX4)(85). No entanto, diferentemente da estrutura de enzima humana resolvida em complexo ternário com ADO, e apresentando ADO ligadas em ambos os sítios de ligação (ADO e ATP), no presente estudo apresentamos duas estruturas inéditas, uma em complexo binário com a ADO ocupando o sítio do ATP, e outra em complexo ternário com a ADO ocupando seu próprio sítio e o ADP ocupando o sítio de ligação ao ATP. Estes complexos permitiram que identificássemos diferenças estruturais entre os complexos binário e o ternário, representativas de modificações conformacionais dinâmicas envolvidas nos mecanismos de catálise da ADK.

A estrutura da enzima humana, em complexo ternário com a ADO, apresenta-se em conformação na qual o domínio *lid* posiciona-se de modo a ocluir os sítios de ligação aos substratos no domínio maior. Na estrutura de ADK de camundongo em complexo binário com a ADO, observamos um ângulo de abertura de cerca de $39,4^\circ$ do domínio *lid* em relação ao domínio maior, e a enzima na conformação totalmente aberta. No entanto, na estrutura do complexo ternário, observamos o domínio *lid* ocluindo completamente os sítios de ligação ao substrato, apresentando-se com uma conformação totalmente fechada, comparada à estrutura da enzima humana disponível (PDB ID1BX4). Assim, a estrutura do complexo binário parece refletir uma situação semelhante àquela da forma apo da enzima, na qual os sítios de ligação aos substratos estão receptivos à interação com os mesmos. De fato, a estrutura do complexo binário tem alta correlação com a estrutura da ADK apo de *Trypanosoma brucei* (PDB ID 4N08).

Um aspecto revelador da estrutura do complexo binário ADK:ADO é que a ocupação do sítio de ligação ao ATP pela ADO aparentemente não afeta os mecanismos estruturais envolvidos nas mudanças conformacionais que determinam e acompanham a

ativação catalítica da ADK. Apesar de não termos a nossa disposição estrutura de ADK murina com ligantes ocupando apenas o sítio de ligação da ADO, o fato de a estrutura do complexo ternário apresentar-se na conformação fechada sugere que a ocupação do sítio de ligação de ADO é crítica para o movimento do domínio *lid* em direção ao domínio maior, oclusão dos sítios de ligação aos substratos e ativação catalítica da ADK. De fato, estruturas de ADK de protozoários com ligantes ocupando o sítio de ligação à ADO apresentam estrutura fechada (86, 135). Parece plausível que a proximidade do sítio de ligação à ADO e da alça que conecta os dois domínios, desempenhe alguma função nas modificações estruturais necessárias para o movimento do domínio *lid* em direção ao domínio maior durante o processo de ativação da ADK.

A descrição estrutural detalhada das interações dos ligantes ADO e ADP nos sítios de ligação aos substratos nos complexos binário e ternário também contribuíram para o esclarecimento do mecanismo catalítico da ADK de camundongo. É importante notar que os substratos ADO e ADP interagem apenas com resíduos do domínio maior, exceção à Arg148 que pertence ao domínio *lid*. De fato, a interação da Arg148 se dá com o fosfato β do ADP, que também interage com um íon Mg^{2+} e moléculas de água que estabilizam o próprio ADP na posição catalítica. Esta configuração indica que na presença do nucleotídeo no sítio, a interação com Arg148 determina o posicionamento correto para o ataque nucleofílico que inicia o processo de hidrólise e transferência do fosfato γ para a ADO.

Identificamos, na estrutura do complexo ternário, um íon potássio ligado entre alças que conectam a extremidade C-terminal e a α -hélice 13 e uma alça formada pelas α -hélices 11 e 12, localizadas próximo ao sítio de ligação do ATP e a sequência DTNGAG que forma um *anion hole*. Nesta estrutura, o K^+ encontra-se hexacoordenado com grupos carbonílicos dos resíduos Arg349, Ile346, Asn312, Gly351 e com Asp310. A Asp310 é parte integral da estrutura do *anion hole* (96). A comparação entre os complexos binário e ternário indicaram que a presença de K^+ perturba a alça entre o segmento Asn304-Ile309, o que, presumivelmente, impacta na ligação do ATP no sítio enzimático. Portanto, as novas estruturas cristalográficas de ADK apresentadas no presente estudo indicam que a ligação de potássio próximo ao sítio de ligação do ATP influencia a reação catalítica. Estes resultados são consistentes com outros, obtidos em enzimas da família das riboquinases que indicam a importância do K^+ na regulação da atividade catalítica (97, 136).

A hipótese de que o K^+ contribui para a atividade catalítica da ADK foi confirmada por experimentos realizados com mutantes após a substituição do resíduo Asp310 (D310A e D310P), crítico para a ligação hexacoordenada do K^+ à ADK. A redução da afinidade da ADK pelo ATP nos mutantes foi confirmada por experimentos bioquímicos (ensaio enzimático) e também por RMN (HSQC). Assim, o conjunto dos dados estruturais e bioquímicos indica um modelo no qual a interação de K^+ com resíduos próximos ao sítio de ligação ao ATP resulta em modificações conformacionais que conduzem à formação de um *anion hole*, que contribui para a transferência catalítica do fosfato γ do ATP para a ADO. Este modelo explica a ativação da ADK por K^+ .

A revelação de que o íon K^+ interage e regula a atividade catalítica da ADK nos estimulou a avaliar a potencial importância deste mecanismo na atividade de ADK em células. Demonstramos que a depleção celular de K^+ acompanha-se, como esperado, de redução da atividade catalítica de ADK. Por outro lado, a reposição de K^+ após a depleção restitui a atividade da ADK, indicando não só a importância do K^+ na regulação da atividade catalítica de ADK em células, mas também a possibilidade de que este se restitua em um mecanismo homeostático que conecta os níveis intracelulares de potássio, e o metabolismo em relação a disponibilidade intra e extracelular de purinas. Situações nas quais este mecanismo pode potencialmente estar envolvido incluem isquemia/hipóxia e inflamação, as quais cursam com depleção intracelular de K^+ e ao mesmo tempo aumento na concentração intracelular de ADO, uma consequência da inibição da ADK.

7. CONCLUSÃO

O conjunto dos nossos estudos estruturais e bioquímicos permite-nos concluir que a ativação catalítica da enzima ADK se dá por um complexo conjunto de fatores que envolve, ligação dos substratos em sítios específicos, modificação conformacional induzida pela ligação do ATP, a qual aproxima a Arg148 localizada no domínio *lid* aos fosfatos β e γ do ATP, e finalmente a ligação de K^+ próximo ao fosfato γ do ATP, que facilita sua hidrólise e transferência para a ADO. A interação com K^+ aparenta exercer um controle no metabolismo de purinas de caráter homeostático. Sua função estaria ligada às respostas celulares em condições como hipóxia/isquemia e inflamação.

8. REFERÊNCIAS

1. Newby AC. Adenosine and the concept of 'retaliatory metabolites'. *Trends in Biochemical Sciences*. 1984;9(2):42-4.
2. Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol*. 2005;67(5):1385-7.
3. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362(4-5):364-74.
4. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):1-34.
5. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53(4):527-52.
6. Cross HR, Murphy E, Black RG, Auchampach J, Steenbergen C. Overexpression of A(3) adenosine receptors decreases heart rate, preserves energetics, and protects ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):H1562-8.
7. Chen Y, Bache RJ. Adenosine: a modulator of the cardiac response to stress. *Circ Res*. 93. United States 2003. p. 691-3.
8. Phillis JW, Goshgarian HG. Adenosine and neurotrauma: therapeutic perspectives. *Neurol Res*. 2001;23(2-3):183-9.
9. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res*. 2001;52(1):25-39.
10. Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Adenosine and stroke: maximizing the therapeutic potential of adenosine as a prophylactic and acute neuroprotectant. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(3):217-27.
11. Rabadi MM, Lee HT. Adenosine receptors and renal ischaemia reperfusion injury. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2015;213(1):222-31.
12. Kroll K, Decking UK, Dreikorn K, Schrader J. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circ Res*. 1993;73(5):846-56.
13. Zylka MJ. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med*. 2011;17(4):188-96.
14. Jacobson KA, Gao Z-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(3):247-64.

15. Boison D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008;8(1):2-7.
16. Stone TW, Ceruti S, Abbracchio MP. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(193):535-87.
17. Amadio S, Apolloni S, D'Ambrosi N, Volonte C. Purinergic signalling at the plasma membrane: a multipurpose and multidirectional mode to deal with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *J Neurochem*. 2011;116(5):796-805.
18. Safarzadeh E, Jadidi-Niaragh F, Motalebnezhad M, Yousefi M. The role of adenosine and adenosine receptors in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Inflamm Res*. 2016;65(7):511-20.
19. Boison D. Adenosinergic signaling in epilepsy. *Neuropharmacology*. 2016;104:131-9.
20. Weltha L, Reemmer J, Boison D. The role of adenosine in epilepsy. *Brain Res Bull*. 2018.
21. Li Q, Li QQ, Jia JN, Liu ZQ, Zhou HH, Mao XY. Targeting gap junction in epilepsy: Perspectives and challenges. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:57-65.
22. Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7(4):426-34.
23. Deussen A, Stappert M, Schäfer S, Kelm M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation*. 1999;99(15):2041-7.
24. Manthei SA, Van Wylen DG. Purine metabolite accumulation during myocardial ischemia: adenosine pretreatment versus brief ischemia. *Basic Res Cardiol*. 1997;92(6):368-77.
25. Pedata F, Corsi C, Melani A, Bordoni F, Latini S. Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:74-84.
26. McAdoo DJ, Robak G, Xu GY, Hughes MG. Adenosine release upon spinal cord injury. *Brain Res*. 2000;854(1-2):152-7.
27. Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem*. 1987;49(1):227-31.
28. Dux E, Fastbom J, Ungerstedt U, Rudolphi K, Fredholm BB. Protective effect of adenosine and a novel xanthine derivative propentofylline on the cell damage after bilateral carotid occlusion in the gerbil hippocampus. *Brain Res*. 1990;516(2):248-56.
29. Gidday JM, Kim YB, Shah AR, Gonzales ER, Park TS. Adenosine transport inhibition ameliorates postischemic hypoperfusion in pigs. *Brain Res*. 1996;734(1-2):261-8.
30. Darvish A, Pomerantz RW, Zografides PG, Metting PJ. Contribution of cytosolic and

membrane-bound 5'-nucleotidases to cardiac adenosine production. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 2):H2162-7.

31. Van Belle H, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol.* 1987;252(5 Pt 2):H886-93.
32. Chaleon J, Perignon JL, Hamet M, Cartier PH. S-adenosylhomocysteine hydrolase activity in defects of enzymes of purine metabolism and inhibition by various purine compounds. *Adv Exp Med Biol.* 1984;165 Pt B:71-4.
33. Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev.* 1998;161:27-42.
34. Ford H, Jr., Dai F, Mu L, Siddiqui MA, Nicklaus MC, Anderson L, et al. Adenosine deaminase prefers a distinct sugar ring conformation for binding and catalysis: kinetic and structural studies. *Biochemistry.* 2000;39(10):2581-92.
35. Singh LS, Sharma R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Mol Cell Biochem.* 2000;204(1-2):127-34.
36. De Jong JW. Partial purification and properties of rat-heart adenosine kinase. *Arch Int Physiol Biochim.* 1977;85(3):557-69.
37. Drabikowska AK, Halec L, Shugar D. Purification and properties of adenosine kinase from rat liver: separation from deoxyadenosine kinase activity. *Z Naturforsch C.* 1985;40(1-2):34-41.
38. Long MC, Escuyer V, Parker WB. Identification and characterization of a unique adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 2003;185(22):6548-55.
39. Ham J, Evans BA. An emerging role for adenosine and its receptors in bone homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:113.
40. Bontemps F, Van den Berghe G, Hers HG. Evidence for a substrate cycle between AMP and adenosine in isolated hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(10):2829-33.
41. Bontemps F, Vincent MF, Van den Berghe G. Mechanisms of elevation of adenosine levels in anoxic hepatocytes. *Biochem J.* 1993;290 (Pt 3):671-7.
42. Bontemps F, Mimouni M, Van den Berghe G. Phosphorylation of adenosine in anoxic hepatocytes by an exchange reaction catalysed by adenosine kinase. *Biochem J.* 1993;290 (Pt 3):679-84.
43. Loncar R, Flesche CW, Deussen A. Determinants of the S-Adenosylhomocysteine (SAH) Technique for the Local Assessment of Cardiac Free Cytosolic Adenosine. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1997;29(5):1289-305.
44. Maj MC, Singh B, Gupta RS. Structure-activity studies on mammalian adenosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275(2):386-93.

45. Krenitsky TA, Miller RL, Fyfe JA. Levels of nucleoside and nucleotide kinases in rhesus monkey tissues. *Biochem Pharmacol.* 1974;23(1):70-2.
46. Snyder FF, Lukey T. Kinetic considerations for the regulation of adenosine and deoxyadenosine metabolism in mouse and human tissues based on a thymocyte model. *Biochim Biophys Acta.* 1982;696(3):299-307.
47. Caputto R. The enzymatic synthesis of adenylic acid; adenosinekinase. *J Biol Chem.* 1951;189(2):801-14.
48. Pak MA, Haas HL, Decking UK, Schrader J. Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. *Neuropharmacology.* 1994;33(9):1049-53.
49. Peart J, Flood A, Linden J, Matherne GP, Headrick JP. Adenosine-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39(1):117-29.
50. McGaraughty S, Cowart M, Jarvis MF, Berman RF. Anticonvulsant and antinociceptive actions of novel adenosine kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem.* 2005;5(1):43-58.
51. Boison D. Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev.* 2013;65(3):906-43.
52. Boison D, Singer P, Shen HY, Feldon J, Yee BK. Adenosine hypothesis of schizophrenia--opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology.* 2012;62(3):1527-43.
53. Annes JP, Ryu JH, Lam K, Carolan PJ, Utz K, Hollister-Lock J, et al. Adenosine kinase inhibition selectively promotes rodent and porcine islet beta-cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(10):3915-20.
54. Nayar U, Sadek J, Reichel J, Hernandez-Hopkins D, Akar G, Barelli PJ, et al. Identification of a nucleoside analog active against adenosine kinase-expressing plasma cell malignancies. *J Clin Invest.* 2017;127(6):2066-80.
55. Pelicano H, Maury G, Elalaoui A, Shafiee M, Imbach JL, Goody RS, et al. Study of the substrate-binding properties of bovine liver adenosine kinase and inhibition by fluorescent nucleoside analogues. *Eur J Biochem.* 1997;248(3):930-7.
56. Lin BB, Hurley MC, Fox IH. Regulation of adenosine kinase by adenosine analogs. *Mol Pharmacol.* 1988;34(4):501-5.
57. Palella TD, Andres CM, Fox IH. Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition. *J Biol Chem.* 1980;255(11):5264-9.
58. Hawkins CF, Bagnara AS. Adenosine kinase from human erythrocytes: kinetic studies and characterization of adenosine binding sites. *Biochemistry.* 1987;26(7):1982-7.
59. Yamada Y, Goto H, Ogasawara N. Adenosine kinase from human liver. *Biochim Biophys Acta.* 1981;660(1):36-43.

60. Lonnroth P, Jansson PA, Fredholm BB, Smith U. Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol.* 1989;256(2 Pt 1):E250-5.
61. Clark RS, Carcillo JA, Kochanek PM, Obrist WD, Jackson EK, Mi Z, et al. Cerebrospinal fluid adenosine concentration and uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism after severe head injury in humans. *Neurosurgery.* 1997;41(6):1284-92; discussion 92-3.
62. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1315-23.
63. Boesiger P, Buchli R, Meier D, Steinmann B, Gitzelmann R. Changes of liver metabolite concentrations in adults with disorders of fructose metabolism after intravenous fructose by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res.* 1994;36(4):436-40.
64. Rotllan P, Miras Portugal MT. Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *Eur J Biochem.* 1985;151(2):365-71.
65. Mimouni M, Bontemps F, Van den Berghe G. Kinetic studies of rat liver adenosine kinase. Explanation of exchange reaction between adenosine and AMP. *J Biol Chem.* 1994;269(27):17820-5.
66. Chang CH, Cha S, Brockman RW, Bennett LL, Jr. Kinetic studies of adenosine kinase from L1210 cells: a model enzyme with a two-site ping-pong mechanism. *Biochemistry.* 1983;22(3):600-11.
67. Henderson JF, Mikoshiba A, Chu SY, Caldwell IC. Kinetic studies of adenosine kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *J Biol Chem.* 1972;247(7):1972-5.
68. Bennett LL, Hill DL. Structural Requirements for Activity of Nucleosides as Substrates for Adenosine Kinase: Orientation of Substituents on the Pentofuranosyl Ring. *Molecular Pharmacology.* 1975;11(6):803.
69. Lindberg B, Klenow H, Hansen K. Some properties of partially purified mammalian adenosine kinase. *J Biol Chem.* 1967;242(3):350-6.
70. Miller RL, Adamczyk DL, Miller WH, Koszalka GW, Rideout JL, Beacham LM, 3rd, et al. Adenosine kinase from rabbit liver. II. Substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem.* 1979;254(7):2346-52.
71. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2013;12:447.
72. Datta AK, Datta R, Sen B. Antiparasitic chemotherapy: tinkering with the purine salvage pathway. *Adv Exp Med Biol.* 2008;625:116-32.
73. Maj MC, Singh B, Gupta RS. Pentavalent ions dependency is a conserved property of adenosine kinase from diverse sources: identification of a novel motif implicated in phosphate

and magnesium ion binding and substrate inhibition. *Biochemistry*. 2002;41(12):4059-69.

74. Parducci RE, Cabrera R, Baez M, Guixe V. Evidence for a catalytic Mg^{2+} ion and effect of phosphate on the activity of *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: regulatory properties of a ribokinase family member. *Biochemistry*. 2006;45(30):9291-9.

75. Rivas-Pardo JA, Caniuguir A, Wilson CA, Babul J, Guixe V. Divalent metal cation requirements of phosphofructokinase-2 from *E. coli*. Evidence for a high affinity binding site for Mn^{2+} . *Arch Biochem Biophys*. 2011;505(1):60-6.

76. Hao W, Gupta RS. Pentavalent ions dependency of mammalian adenosine kinase. *Biochem Mol Biol Int*. 1996;38(5):889-99.

77. Sen B, Chakraborty A, Datta R, Bhattacharyya D, Datta AK. Reversal of ADP-mediated aggregation of adenosine kinase by cyclophilin leads to its reactivation. *Biochemistry*. 2006;45(1):263-71.

78. Park J, Gupta RS. Adenosine kinase and ribokinase--the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(18):2875-96.

79. Juranka P, Chan VL. Analysis of adenosine kinase mutants of baby hamster kidney cells using affinity-purified antibody. *J Biol Chem*. 1985;260(12):7738-43.

80. Singh B, Hao W, Wu Z, Eigl B, Gupta RS. Cloning and characterization of cDNA for adenosine kinase from mammalian (Chinese hamster, mouse, human and rat) species. High frequency mutants of Chinese hamster ovary cells involve structural alterations in the gene. *Eur J Biochem*. 1996;241(2):564-71.

81. Spsychala J, Datta NS, Takabayashi K, Datta M, Fox IH, Gribbin T, et al. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1232-7.

82. McNally T, Helfrich RJ, Cowart M, Dorwin SA, Meuth JL, Idler KB, et al. Cloning and expression of the adenosine kinase gene from rat and human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(3):645-50.

83. Sakowicz M, Grden M, Pawelczyk T. Expression level of adenosine kinase in rat tissues. Lack of phosphate effect on the enzyme activity. *Acta Biochim Pol*. 2001;48(3):745-54.

84. Sahin B, Kansy JW, Nairn AC, Spsychala J, Ealick SE, Fienberg AA, et al. Molecular characterization of recombinant mouse adenosine kinase and evaluation as a target for protein phosphorylation. *Eur J Biochem*. 2004;271(17):3547-55.

85. Mathews, II, Erion MD, Ealick SE. Structure of human adenosine kinase at 1.5 Å resolution. *Biochemistry*. 1998;37(45):15607-20.

86. Cook WJ, DeLucas LJ, Chattopadhyay D. Crystal structure of adenosine kinase from *Toxoplasma gondii* at 1.8 Å resolution. *Protein Sci*. 2000;9(4):704-12.

87. Schumacher MA, Scott DM, Mathews, II, Ealick SE, Roos DS, Ullman B, et al. Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *J Mol Biol.* 2000;298(5):875-93.
88. Muchmore SW, Smith RA, Stewart AO, Cowart MD, Gomtsyan A, Matulenko MA, et al. Crystal structures of human adenosine kinase inhibitor complexes reveal two distinct binding modes. *J Med Chem.* 2006;49(23):6726-31.
89. Reddy MC, Palaninathan SK, Shetty ND, Owen JL, Watson MD, Sacchettini JC. High resolution crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* adenosine kinase: insights into the mechanism and specificity of this novel prokaryotic enzyme. *J Biol Chem.* 2007;282(37):27334-42.
90. Zhang Y, El Kouni MH, Ealick SE. Substrate analogs induce an intermediate conformational change in *Toxoplasma gondii* adenosine kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63(Pt 2):126-34.
91. Kuettel S, Greenwald J, Kostrewa D, Ahmed S, Scapozza L, Perozzo R. Crystal structures of *T. b. rhodesiense* adenosine kinase complexed with inhibitor and activator: implications for catalysis and hyperactivation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e1164.
92. Cassera MB, Ho MC, Merino EF, Burgos ES, Rinaldo-Matthis A, Almo SC, et al. A high-affinity adenosine kinase from *Anopheles gambiae*. *Biochemistry.* 2011;50(11):1885-93.
93. Romanello L, Bachega JF, Cassago A, Brandao-Neto J, DeMarco R, Garratt RC, et al. Adenosine kinase from *Schistosoma mansoni*: structural basis for the differential incorporation of nucleoside analogues. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2013;69(Pt 1):126-36.
94. Timm J, González-Pacanowska D, Wilson KS. Structures of adenosine kinase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2014;70(Pt 1):34-9.
95. Crespo RA, Dang Q, Zhou NE, Guthrie LM, Snavely TC, Dong W, et al. Structure-Guided Drug Design of 6-Substituted Adenosine Analogues as Potent Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Adenosine Kinase. *J Med Chem.* 2019;62(9):4483-99.
96. A Sigrell J, Cameron A, Alwyn Jones T, Mowbray S. Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: Insights into a new family of kinase structures 1998. 183-93.
97. Andersson CE, Mowbray SL. Activation of ribokinase by monovalent cations. *J Mol Biol.* 2002;315(3):409-19.
98. Baez M, Cabrera R, Pereira HM, Blanco A, Villalobos P, Ramírez-Sarmiento CA, et al. A ribokinase family conserved monovalent cation binding site enhances the MgATP-induced inhibition in *E. coli* phosphofructokinase-2. *Biophysical journal.* 2013;105(1):185-93.
99. Park J, van Koeversden P, Singh B, Gupta RS. Identification and characterization of human ribokinase and comparison of its properties with *E. coli* ribokinase and human adenosine kinase. *FEBS Lett.* 2007;581(17):3211-6.

100. Sigrell JA, Cameron AD, Mowbray SL. Induced fit on sugar binding activates ribokinase. *J Mol Biol.* 1999;290(5):1009-18.
101. Arnfors L, Hansen T, Schonheit P, Ladenstein R, Meining W. Structure of *Methanocaldococcus jannaschii* nucleoside kinase: an archaeal member of the ribokinase family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006;62(Pt 9):1085-97.
102. Schumacher M, M Scott D, Mathews I, E Ealick S, S Roos D, Ullman B, et al. Crystal structures of *Toxoplasma gondii* adenosine kinase reveal a novel catalytic mechanism and prodrug binding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(2):549-67.
103. Kursula P, Ojala J, Lambeir AM, Wierenga RK. The catalytic cycle of biosynthetic thiolase: a conformational journey of an acetyl group through four binding modes and two oxyanion holes. *Biochemistry.* 2002;41(52):15543-56.
104. Jarvis MF, Yu H, Kohlhaas K, Alexander K, Lee CH, Jiang M, et al. ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2, 3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: I. In vitro characterization and acute antinociceptive effects in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(3):1156-64.
105. Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol.* 1989;256(4 Pt 1):C799-806.
106. Kowaluk EA, Bhagwat SS, Jarvis MF. Adenosine kinase inhibitors. *Curr Pharm Des.* 1998;4(5):403-16.
107. Britton DR, Mikusa J, Lee CH, Jarvis MF, Williams M, Kowaluk EA. Site and event specific increase of striatal adenosine release by adenosine kinase inhibition in rats. *Neurosci Lett.* 1999;266(2):93-6.
108. Wiesner JB, Ugarkar BG, Castellino AJ, Barankiewicz J, Dumas DP, Gruber HE, et al. Adenosine kinase inhibitors as a novel approach to anticonvulsant therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(3):1669-77.
109. Miller LP, Jelovich LA, Yao L, DaRe J, Ugarkar B, Foster AC. Pre- and peristroke treatment with the adenosine kinase inhibitor, 5'-deoxyiodotubercidin, significantly reduces infarct volume after temporary occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neurosci Lett.* 1996;220(2):73-6.
110. Jiang N, Kowaluk EA, Lee CH, Mazdiyasni H, Chopp M. Adenosine kinase inhibition protects brain against transient focal ischemia in rats. *Eur J Pharmacol.* 1997;320(2-3):131-7.
111. McGaraughty S, Cowart M, Jarvis MF. Recent developments in the discovery of novel adenosine kinase inhibitors: mechanism of action and therapeutic potential. *CNS Drug Rev.* 2001;7(4):415-32.
112. Cottam HB, Wasson DB, Shih HC, Raychaudhuri A, Di Pasquale G, Carson DA. New adenosine kinase inhibitors with oral antiinflammatory activity: synthesis and biological evaluation. *J Med Chem.* 1993;36(22):3424-30.

113. Theofilas P, Brar S, Stewart KA, Shen HY, Sandau US, Poulsen D, et al. Adenosine kinase as a target for therapeutic antisense strategies in epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52(3):589-601.
114. Masino SA, Kawamura M, Jr., Ruskin DN, Gawryluk J, Chen X, Geiger JD. Purines and the Anti-Epileptic Actions of Ketogenic Diets. *Open Neurosci J*. 2010;4(1):58-63.
115. Morote-Garcia JC, Rosenberger P, Kuhlicke J, Eltzschig HK. HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak. *Blood*. 2008;111(12):5571-80.
116. Wardell K, Jakobsson A, Nilsson GE. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1993;40(4):309-16.
117. Adler AJ, Greenfield NJ, Fasman GD. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol*. 1973;27:675-735.
118. Greenfield NJ. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2733-41.
119. Gilliland GL. Biological Macromolecule Crystallization Database. *Methods Enzymol*. 1997;277:546-56.
120. Penkova A, Chayen N, Saridakis E, Nanev CN. Nucleation of protein crystals in a wide continuous supersaturation gradient. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002;58(Pt 10 Pt 1):1606-10.
121. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W597-603.
122. Moreno A. Advanced Methods of Protein Crystallization. *Methods Mol Biol*. 2017;1607:51-76.
123. Pflugrath JW. Practical macromolecular cryocrystallography. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2015;71(Pt 6):622-42.
124. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*. 1997;276:307-26.
125. Vagin A, Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 1):22-5.
126. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60(Pt 12 Pt 1):2126-32.
127. Charter NW, Kauffman L, Singh R, Eglen RM. A generic, homogenous method for measuring kinase and inhibitor activity via adenosine 5'-diphosphate accumulation. *J Biomol Screen*. 2006;11(4):390-9.
128. McIntosh LP, Wand AJ, Lowry DF, Redfield AG, Dahlquist FW. Assignment of the

backbone ^1H and ^{15}N NMR resonances of bacteriophage T4 lysozyme. *Biochemistry*. 1990;29(27):6341-62.

129. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR*. 1995;6(3):277-93.

130. Johnson BA, Blevins RA. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of Biomolecular NMR*. 1994;4(5):603-14.

131. Sattler M, Schleucher J, Griesinger C. Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 1999;34:93-158.

132. Kim S, Szyperski T. GFT NMR, a new approach to rapidly obtain precise high-dimensional NMR spectral information. *J Am Chem Soc*. 2003;125(5):1385-93.

133. Brender JR, Krishnamoorthy J, Ghosh A, Bhunia A. Binding Moiety Mapping by Saturation Transfer Difference NMR. *Methods Mol Biol*. 2018;1824:49-65.

134. del Carmen Fernandez-Alonso M, Diaz D, Berbis MA, Marcelo F, Canada J, Jimenez-Barbero J. Protein-carbohydrate interactions studied by NMR: from molecular recognition to drug design. *Curr Protein Pept Sci*. 2012;13(8):816-30.

135. Timm J, Gonzalez-Pacanowska D, Wilson KS. Structures of adenosine kinase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014;70(Pt 1):34-9.

136. Larsen TM, Laughlin LT, Holden HM, Rayment I, Reed GH. Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+} , K^{+} , and pyruvate. *Biochemistry*. 1994;33(20):6301-9.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Autorização da Springer Nature para reprodução integral do artigo referente as atividades desenvolvidas durante o doutorado.



RightsLink®

SPRINGER NATURE

Title: Adenosine Kinase couples sensing of cellular potassium depletion to purine metabolism
Author: Renata Rocha de Oliveira et al
Publication: Scientific Reports
Publisher: Springer Nature
Date: Aug 10, 2018
 Copyright © 2018, Springer Nature

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

To order reprints of this content, please contact Springer Nature by e-mail at reprintswarehouse@springernature.com, and you will be contacted very shortly with a quote.

ANEXO 2 - Reporte de validação da Estrutura de raio-x depositada no PDB: código 5KB5

Full wwPDB X-ray Structure Validation Report ⓘ

Mar 8, 2018 – 10:28 pm GMT

PDB ID : 5KB5
Title : Crystal structure of the adenosine kinase from *Mus musculus* in complex with adenosine and adenosine-diphosphate
Authors : Oliveira, R.R.; Neto, R.M.; Polo, C.C.; Tonoli, C.C.C.; Murakami, M.T.; Franchini, K.G.
Deposited on : 2016-06-02
Resolution : 1.80 Å(reported)

Acesso: https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/kb/5kb5/5kb5_full_validation.pdf

ANEXO 3- Reporte de validação da Estrutura de raio-x depositada no PDB: código 5KB6

Full wwPDB X-ray Structure Validation Report ⓘ

Mar 13, 2018 – 10:25 pm GMT

PDB ID : 5KB6
Title : High-resolution structure of the adenosine kinase from *Mus musculus* in complex with adenosine
Authors : Oliveira, R.R.; Neto, R.M.; Polo, C.C.; Tonoli, C.C.C.; Murakami, M.T.; Franchini, K.G.
Deposited on : 2016-06-02
Resolution : 1.20 Å(reported)

Acesso: https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/kb/5kb6/5kb6_full_validation.pdf

ANEXO 4 - Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Uso de Organismos geneticamente modificados.



Campinas, 24 de Junho de 2019

Para Programa de pós-graduação

Ref. Declaração de Biossegurança

Prezado coordenador, declaramos para fins da defesa de tese que **Renata Rocha de Oliveira**, desenvolve seu projeto de pesquisa associado a sua tese, intitulada **"MECANISMO ESTRUTURAL DE REGULAÇÃO ALOSTÉRICA POR POTÁSSIO DA ENZIMA ADENOSINA QUINASE"**, sob orientação do prof. Dr. Kleber Gomes Franchini. O projeto utiliza organismos geneticamente modificados classe de risco 2, cumprindo os requisitos de biossegurança necessários, que integram o protocolo CIBio 2015-57, o qual foi **APROVADO** para execução no CNPEM.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini
Orientador

Dr. Marcio Chaim Bajgelman
Presidente da CIBio - CNPEM