



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i de Microbiologia

I

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina

**RIBONUCLEOTIDIL-REDUCTASES
BACTERIANES: ESTUDI ENZIMÀTIC,
GENÈTIC I EVOLUTIU**

Eduard Torrents Serra

2001

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

I

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina

**RIBONUCLEOTIDIL REDUCTASES BACTERIANES:
ESTUDI ENZIMÀTIC, GENÈTIC I EVOLUTIU**

Memòria presentada per optar
al grau de doctor en Ciències
Biològiques, per la Universitat
Autònoma de Barcelona,
per
Eduard Torrents Serra

Vist-i-plau dels directors de la Tesi

Dr. Isidre Gibert González

i

Dr. Albert Jordan Vallès

Bellaterra, Juliol de 2001

I després, quan davant teu s'obriran tants camins i no sabràs quin d'ells triar, no n'agafis un perquè sí, sinó asseu-te i espera. Respira amb la profunditat confiada amb la qual vas respirar el dia que vas venir a aquest món, sense que res et distragués; espera i espera més encare. Queda't quieta, en silenci, i escolta el teu cor. Quan et parli, aleshores aixeca't i vés on ell et porti.

Susanna Tamaro (Ves on et porti el cor)

Cuando alguien busca, suele ocurrir que sus ojos sólo ven aquello que anda buscando, y ya no logra encontrar nada ni se vuelve receptivo a nada porque sólo piensa en lo que busca, porque tiene un objetivo y se halla poseído por él. Buscar significa tener un objetivo. Pero encontrar significa ser libre, estar abierto, carecer de objetivos.

Hermann Hesse (Siddaharta)

Presentació	4
Resum	5
Llistat d'articles:	7
Abreviatures	9
1. Introducció	11
1.1. Introducció general	11
1.2. L'enzim ribonucleotidil-reductasa	12
1.3. Antecedents	12
1.4. Les classes	15
1.5. La regulació al·lostèrica	18
1.6. Mecanismes catalítics	19
1.6.1. Donadors d'electrons fisiològics	19
1.6.2. Generació del radical i estabilitat	22
1.6.3. Transferència del radical	25
1.6.4. Mecanisme de reacció	26
1.7. Classe I	27
1.7.1. Classe Ia procariòtica	28
1.7.1.1. Estructura de la subunitat R1A	29
1.7.1.1.1. El centre actiu	29
1.7.1.1.2. Llocs al·lostèrics	30
1.7.1.2. Estructura de la subunitat R2B	32
1.7.2. Classe Ib	34
1.7.2.1. Estructura de la subunitat R1E	35
1.7.2.2. Estructura de la subunitat R2F	35
1.7.3. Classe Ia eucariòtica	37
1.7.3.1. Estructura de la subunitat R2B	37
1.8. Classe II	37
1.9. Classe III	40
1.9.1. Estructura de la Ribonucleotidil-Reductasa del fag T4	43
1.9.2. Similitud entre la RNR amb la piruvat format liasa	45
1.10. Organització i regulació genètica	45
1.10.1. Els gens <i>nrdAB</i> procariòtics (classe Ia)	46
1.10.2. Els gens <i>nrdEF</i> (classe Ib)	47
1.10.3. Els gens <i>nrdAB</i> eucariòtics (Classe Ia)	50

1.10.3.1	Ratolí	50
1.10.3.2	Llevat	51
1.10.4.	Els gens <i>nrdDG</i> (classe III)	52
1.11.	Distribució i evolució de les Ribonucleotidil-Reductases	53
2.	Objectius	59
3.	Resultats i discussió	61
3.1.	Ribonucleotidil-Reductases de classe III (articles I i V)	61
3.1.1.	Essencialitat dels gens <i>nrdDG</i> en condicions anaeròbiques	61
3.1.2.	Estudi enzimàtic de la RNR de classe III de <i>Lactococcus lactis</i>	63
3.1.2.1	<i>L. lactis</i> conté els gens <i>nrdDG</i>	63
3.1.2.2	Purificació i caracterització de les proteïnes NrdD i NrdG. Propietats catalítiques de l'enzim	65
3.1.2.3	Regulació al·lostèrica	67
3.2.	Ribonucleotidil-Reductases dependents d'AdoCob, classe II (article II)	69
3.2.1.	Identificació i caracterització bioquímica de RNR de classe II present en bacteris filogenèticament primitius	70
3.2.2.	Relacions estructurals amb les classes I i III	72
3.3.	Identificació i caracterització de la RNR de <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> (articles III, VI i IX)	74
3.3.1.	Aïllament dels gens que codifiquen per a la RNR de <i>C. ammoniagenes</i>	75
3.3.2.	La RNR de <i>C. ammoniagenes</i> pertany a la classe Ib. Caracterització bioquímica de l'enzim	77
3.3.3.	La RNR de <i>C. ammoniagenes</i> és dependent de ferro	78
3.3.4.	Anàlisi transcripcional de la regió <i>nrdHIEF</i> de <i>C. ammoniagenes</i>	79
3.4.	Presència de diferents RNR dins d'un mateix microorganisme (article IV)	80
3.4.1.	Distribució dels gens corresponents a les RNR de classes I, II i III en el grup de les <i>Pseudomonas</i>	80
3.4.2.	<i>P. aeruginosa</i> i <i>P. stutzeri</i> expressen la classe I i II simultàniament. Caracterització bioquímica	82
3.5.	Distribució i evolució de les RNR (articles VII i VIII)	83
3.5.1.	Distribució de les RNR en el grup dels γ -proteobacteris	83
3.5.2.	Evolució de les RNR	84
4.	Conclusions	89
5.	Bibliografia	93
6.	ARTICLES I-IX	105

6.1.	Article I	107
6.2.	Article II	113
6.3.	Article III	121
6.4.	Article IV	133
6.5.	Article V	143
6.6.	Article VI	155
6.7.	Article VII	165
6.8.	Article VIII	173
6.9.	Article IX	199
7.	Agraïments	219

Presentació

Les Ribonucleotidil-Reductases (RNR) són enzims essencials per a tota cèl·lula perquè realitzen la transformació dels ribonucleòtids a desoxiribonucleòtids, els quals són necessaris per a la síntesi de l'àcid desoxiribonucleic (DNA).

Per la seva estructura i les seves característiques bioquímiques les RNR es divideixen en tres classes. Durant molt de temps només els prototips d'aquestes classes eren ben caracteritzats: les RNR de classe I d'*Escherichia coli* i ratolí, l'enzim de classe II de *Lactobacillus leichmannii* i la classe III d'*E. coli*.

Hi ha un interès creixent en la caracterització de les RNR d'altres bacteris i organismes per entendre'n millor les diferències i similituds i, en definitiva, comprendre millor el funcionament d'aquest enzim i el seu paper en el cicle vital de tota cèl·lula. L'explosió de la seqüenciació de genomes bacterians ha contribuït a despertar l'interès en les RNR bacterianes i ha posat de relleu fets molt interessants sobre la coexistència de diferents RNR en una mateixa cèl·lula.

Durant el meu període de tesi, el nostre interès ha estat estudiar les RNR en l'àmbit genètic i bioquímic de diferents bacteris pertanyents a diferents classes per intentar respondre diverses qüestions que ens han anat captivant al llarg d'aquests anys. Per exemple, quin paper juguen i com es regulen genèticament les diferents RNR d'un bacteri exposat a diverses condicions oxigèniques? Quin tipus d'enzim es troba en bacteris filogenèticament antics? Com es produïa la reducció de ribonucleòtids en les condicions anoxigèniques de la Terra fa milions d'anys, exemplificat pel funcionament de les RNR anaeròbiques actuals?. Per què alguns bacteris tenen tantes RNR diferents, aparentment redundants? Tenen totes les RNR actuals un ancestre comú, i quina RNR és més semblant i propera a aquell ancestre?

Aquest treball està dividit en tres blocs principals: introducció, resultats i discussió i articles. A la introducció es revisen els aspectes bioquímics, enzimàtics, estructurals, genètics i evolutius de les RNR. En els articles s'inclouen les nou publicacions que han derivat d'aquesta tesi, les quals s'analitzen en la secció resultats i discussió.

Resum

Les Ribonucleotidil-Reductases (RNR) són metal·loenzims (E.C. 1.17.4.1) que catalitzen la reducció dels ribonucleòtids (NTP) als seus corresponents desoxiribonucleòtids (dNTP), que són els monòmers principals per a la síntesi del DNA.

Fins al moment s'han descrit tres classes de RNR (I, II i III) atenent la seva estructura, metall, radical i cofactors necessaris per a la catàlisi. Mantenen en comú la seva regulació al·lostèrica i l'ús d'un radical lliure proteic per iniciar la reducció enzimàtica.

La classe I sols és activa en condicions aeròbiques, i es troba distribuïda en eucariotes, procarïotes i virus. Se subdivideix en les classes Ia i Ib codificades pels gens *nrdAB* i *nrdEF*, respectivament. La classe II codificada pel gen *nrdJ*, funciona tant en absència com en presència d'O₂. Es troba en procarïotes i en alguns bacteriòfags. Finalment, la classe III codificada pels gens *nrdDG*, només és activa en condicions d'anaerobiosi estricta i es troba en els procarïotes.

En aquest treball s'ha dut a terme l'estudi de diverses RNR bacterianes pertanyents a les tres classes d'RNR des del punt de vista enzimàtic, genètic i evolutiu. Així, s'ha estudiat les RNR de classe III d'*E. coli* i *Lactococcus lactis*, la classe II en *Deinococcus radiodurans* i *Thermotoga maritima* i la classe Ib de *Corynebacterium ammoniagenes*.

Bacteris com ara *E. coli* contenen RNR pertanyents a diferents classes i amb distints requeriments d'oxigen. Hem investigat l'essencialitat d'aquests enzims sota diferents condicions d'oxigenia. Els gens *nrdDG* d'*E. coli* (classe III) són essencials quan el bacteri creix en condicions d'anaerobiosi estricta. Un mutant per a aquests gens creix, sorprenentment, en situacions de microaerofília perquè sobreprodueix les proteïnes NrdA i NrdB.

D'altra banda, el treball dut a terme amb els gens *nrdD* i *nrdG* (que codifiquen una RNR de classe III) de *L. lactis* ha permès determinar que també són imprescindibles quan el bacteri creix anaeròbicament. Hem estudiat extensament en l'àmbit bioquímic i enzimàtic la RNR anaeròbica d'aquest bacteri per comparar les seves propietats amb el prototip de la classe III, l'enzim d'*E. coli*. La purificació de les proteïnes NrdD i NrdG i la caracterització de l'activitat ribonucleotidil-reductasa *in vitro*, han demostrat que aquest enzim conserva les propietats bioquímiques de la classe anaeròbica d'*E. coli*. La reacció es dona en dues etapes: en la primera es produeix l'activació de la proteïna NrdD amb la participació de la proteïna NrdG, DTT, S-adenosilmetionina i un sistema reductor format per la flavodoxina i flavodoxina reductasa. En la segona etapa té lloc la reducció dels ribonucleòtids dependent de DTT, ions potassi, format i ATP. Es tracta d'un enzim regulat al·lostèricament presentant dos llocs d'unió als efectors; el lloc que regula l'especificitat pel substrat uneix dATP, dGTP i dTTP, i el lloc que regula l'activitat general, que uneix dATP per inhibir-lo i ATP per activar-lo. La unió de l'ATP dona lloc a una cinètica sigmoïdal amb un alt grau de cooperativitat i comunicació entre els dos llocs al·lostèrics. El treball realitzat demostra

que el procés de reducció anaeròbic és igual en diferents microorganismes i es conserva al llarg de l'evolució.

En una altra àrea d'estudi hem demostrat que eubacteris profundament arrelats en l'arbre filogenètic contenen una RNR de classe II. La caracterització de la classe II s'ha realitzat amb dos microorganismes ancestrals com són: *Deinococcus radiodurans* i *Thermotoga maritima*. La proteïna purificada NrdJ de 105 kDa (classe II) de *D. radiodurans*, és dependent d'AdoCob així com d'ions magnesi, calci i d'ATP o dATP. La comparació de les proteïnes NrdJ de *D. radiodurans* i *T. maritima* amb les proteïnes NrdA (classe Ia), mostra que hi ha una relació estructural ja que es troben tots els aa implicats en l'activitat catalítica de l'enzim, la qual cosa reforça la idea d'un ancestre comú per a totes les RNR.

Durant més de 20 anys s'ha considerat que la RNR de *C. ammoniagenes* era dependent de manganès i s'ha proposat que era el prototip d'una hipotètica quarta classe de RNR. Mitjançant dues aproximacions diferents hem clonat els gens que codifiquen la RNR d'aquest bacteri i hem establert que es tracta de gens *nrdEF* i hem purificat l'enzim. El nostre treball demostra que la proteïna purificada R2F uneix ferro en lloc de manganès en la seva forma activa. Tot plegat ha permès establir que la RNR de *C. ammoniagenes* pertany a la classe Ib, tant genèticament com bioquímicament. L'anàlisi transcripcional d'aquesta regió demostra l'existència de promotors independents per als trànscripats *nrdHIE* i *nrdF*. S'ha trobat que la quantitat de mRNA de trànscripats *nrdF* és deu vegades superior al trànscripats *nrdF*. Aquest sistema es veu incrementat tant per la presència d'hidroxiurea, aigua oxigenada i per la presència de ferro i manganès en el medi. Aquests fets ens fan pensar en un possible paper de reguladors transcripcionals del tipus FUR/DtxR i de la resposta sota control dels sistemes antioxidatius cel·lulars.

Molts bacteris contenen més d'una RNR, sovint pertanyent a diferents classes com a conseqüència de les diverses condicions oxigèniques en què el bacteri pot desenvolupar-se. Aquest fet troba el seu extrem en diverses *Pseudomonas* que contenen els gens per RNR de les tres classes. Hem descrit que en condicions de creixement aeròbic, extractes de *Pseudomonas aeruginosa* contenen simultàniament activitat RNR de classes I i II.

L'estudi de la distribució de les diferents RNR en el grup dels γ -proteobacteris mostra l'heterogeneïtat de classes presents en aquest grup, la qual cosa respon a derives evolutives o pressions ecològiques que encara no podem entendre. Sols hi ha una constant que és la presència en totes les espècies analitzades dels gens *nrdDG*, els quals coexisteixen amb els gens *nrdAB*, *nrdEF* i/o *nrdJ*.

Finalment, l'existència d'un nombre creixent de gens que codifiquen RNR de bacteris i organismes molt diferents ens ha permès dibuixar arbres filogenètics que ajuden a entendre l'evolució d'aquest enzim i a formular hipòtesis sobre els seus orígens. Podem dir que totes les RNR provenen d'un ancestre comú que, per divergència evolutiva va donar lloc a les tres classes d'RNR que trobem en l'actualitat.

Llistat d'articles:

Aquest treball es basa en els articles següents, als quals es fa referència en el text mitjançant el seu corresponent número romà:

Article I. Garriga, X., Eliasson, R., **Torrents, E.**, Jordan, A., Barbe, J., Gibert, I., Reichard, P. (1996). *nrdD* and *nrdG* genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 229:189-192

Article II. Jordan, A., **Torrents, E.**, Jeanthon, C., Eliasson, R., Hellman, U., Wernstedt, C., Barbe, J., Gibert, I., Reichard, P. (1997). B12-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:13487-13492

Article III. Fieschi, F., **Torrents, E.**, Touloukhonova, L., Jordan, A., Hellman, U., Barbe, J., Gibert, I., Karsson, M., Sjöberg, BM. (1998). The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. J. Biol. Chem. 273:4329-4337

Article IV. Jordan, A., **Torrents, E.**, Sala, I., Hellman, U., Gibert, I., Reichard, P. (1999). Ribonucleotide reduction in *Pseudomonas* species: simultaneous presence of active enzymes from different classes. J. Bacteriol. 181:3974-3980

Article V. **Torrents, E.**, Buist, G., Liu, A., Eliasson, R., Kok, J., Gibert, I., Graslund, A., Reichard, P. (2000). The anaerobic (class III) ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis*. Catalytic properties and allosteric regulation of the pure enzyme system. J. Biol. Chem. 275:2463-2471

Article VI. Huque, Y., Fieschi, F., **Torrents, E.**, Gibert, I., Eliasson, R., Reichard, P., Sahlin, M., Sjöberg, BM. (2000). The active form of the R2F protein of class Ib ribonucleotide reductase from *Corynebacterium ammoniagenes* is a diferric protein. J. Biol. Chem. 275:25365-25371

Article VII. Torrents, E., Jordan, A., Karlsson, M., Gibert, I. (2000). Occurrence of multiple ribonucleotide reductase classes in gamma-proteobacteria species. *Curr. Microbiol.* 41:346-351

Article VIII. Torrents, E., Patrick Aloy, Isidre Gibert and Francisco Rodríguez-Trelles. (2001). Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. Manuscrit en preparació.

Article IX. Torrents, E., Roca, I. i Gibert, I. (2001). Caracterització genètica de la regió *nrdHIEF* que codifica la Ribonucleotidil-Reductasa de classe Ib de *Corynebacterium ammoniagenes*. Manuscrit en preparació.

Abreviatures

2', 3' o β -C	Carboni 2', 3' o β
A	Adenina o adenosina
aa	Aminoàcids
AdoCob	5'-desoxiadenosilcobalamina (Vitamina B12)
AdoMet	5'-desoxiadenosilmetionina
Apo-R2	Proteïna R2 salvatge, sense Fe ni radical
C	Citosina o citidina
cpm	Comptes per minut
C-terminal	Part carboxiterminal d'una proteïna
Da	Daltons
(d)NDP	(Desoxi)ribonucleòsid 5'-difosfat o (Desoxi)ribonucleòtid
(d)NTP	(Desoxi)ribonucleòsid 5'-trifosfat o (Desoxi)ribonucleòtid
DAF	Deazaflavin
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DTT	Ditiotreitòl
EPR	"Electron paramagnetic resonance" (Ressonància paramagnètica de l'electró)
FIS	"Factor for inversion stimulation" (Factor per a l'estimulació de la inversió)
FAD ⁽⁺⁾ (H ₂)	Flavina adenina dinucleòtid (forma oxidada) (forma reduïda)
FNR	Fumarat nitrat reductasa
FPLC	Fast protein liquid chromatography.
FUR	Ferric Uptake Regulator
G	Guanina o guanosina
Grx	Glutaredoxina/es
GSH i GSSG	Glutatió reduït i la seva forma disulfur (oxidada)
HU	Hidroxiurea
kpb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
K _m	Constant de Michaelis-Menten
L.A.R.A	Lloc al·lostèric que controla la regulació de l'activitat de l'enzim. (" <i>activity site</i> ")
L.A.R.E	Lloc al·lostèric que controla la regulació de l'especificitat de l'enzim. (" <i>specificity site</i> ")
L.U.AC	Lloc d'unió a la adenosilcobalamina (AdoCob)
Met-R2	Proteïna R2 amb el Fe però sense el radical
mRNA	RNA missatger o transcrit
NADP ⁽⁺⁾ (H+H ⁺)	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid-fosfat (forma oxidada) (forma reduïda)
NrdAB	Subunitat gran i petita de les RNR de classe Ia
NrdDG	Subunitat gran i petita de les RNR de classe III
NrdEF	Subunitat gran i petita de les RNR de classe Ib

NrdJ	RNR de classe II
N-terminal	Part aminoterminal d'una proteïna
ORF	"Open reading frame" (Marc obert de lectura)
pb	Parells de bases
PCR	"Polymerase chain reaction" (Reacció en cadena de la polimerasa)
PFL	Piruvat format liasa
R1A(E)	Subunitat gran de la RNR de la classe Ia (Ib)
R2B(F)	Subunitat petita de la RNR de la classe Ia (Ib)
RBS	"Ribosome binding site" (Lloc d'unió del ribosoma)
REP	"Repetitive extragenic palindromic" (Seqüència palindròmica extragènica i repetitiva)
RNA	Àcid ribonucleic
RNR	Ribonucleotidil reductasa
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	"Reverse transcriptase-PCR" (Transcriptasa inversa-PCR)
SDS-PAGE	Gel d'electroforesi de poliacrilamida en SDS
SH	Grup tiol o sulfhidril
T	Timina o timidina
tRNA	RNA de transferència
Trx	Tioredoxina
ts	Termosensible
U	Uracil o uridina

Aminoàcids

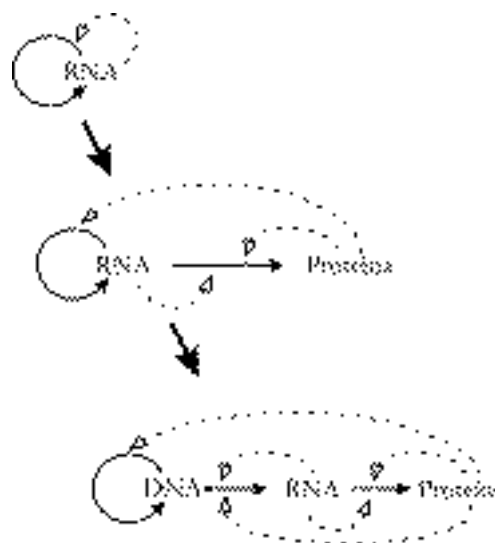
Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparragina
Asp (D)	Àcid aspàrtic
Cys (C)	Cisteïna
Glu (E)	Àcid glutàmic
Gln (Q)	Glutamina
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptòfan
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

1. Introducció

1.1. Introducció general

L'autoreplicació del material genètic i el metabolisme cel·lular són dues de les característiques principals de la vida. Tres macromolècules són les involucrades en aquests processos químics: l'àcid desoxiribonucleic (DNA), l'àcid ribonucleic (RNA) i les proteïnes. El DNA és la molècula que conté la informació genètica per codificar les proteïnes i la seva regulació. El DNA es replica i es transmet a la generació següent. Les proteïnes constitueixen els enzims que estan implicats en els processos metabòlics i en el marc estructural de totes les cèl·lules. La informació del DNA és copiada a RNA, la molècula missatgera que actua com a motlle per a la síntesi de proteïnes. El flux de la informació des del DNA cap a les proteïnes és unidireccional i aquest és el dogma central de la biologia molecular (figura 1), tal com ho va descriure Watson en els anys cinquanta (Lewin, 1990).

Figura 1. Dogma central de la biologia molecular. Possible evolució de la informació genètica des d'un món de RNA fins al món actual de DNA i proteïnes. Les línies contínues representen processos autoreplicatius i de direccionalitat. Les línies discontinües indiquen el tipus de reacció on la molècula participa.



Un primer requisit per a la síntesi del DNA és el subministrament equilibrat de deoxiribonucleòtids trifosfat (dNTP). L'única via per a la síntesi *de novo* de dNTP és la reacció catalitzada per l'enzim ribonucleotidil reductasa (RNR), que converteix els ribonucleòtids (NTP) als seus corresponents deoxiribonucleòtids trifosfat (dNTP), eliminat el grup 2'-hidroxil i substituint-lo per un hidrogen, tal com es mostra a la figura 2 (Sjöberg, 1997; Reichard, 1997; Jordan, 1998). Les RNR són enzims

ancestrals de gran importància en el procés evolutiu, ja que la seva aparició va permetre la transició del món de RNA al de DNA (Reichard, 1993).

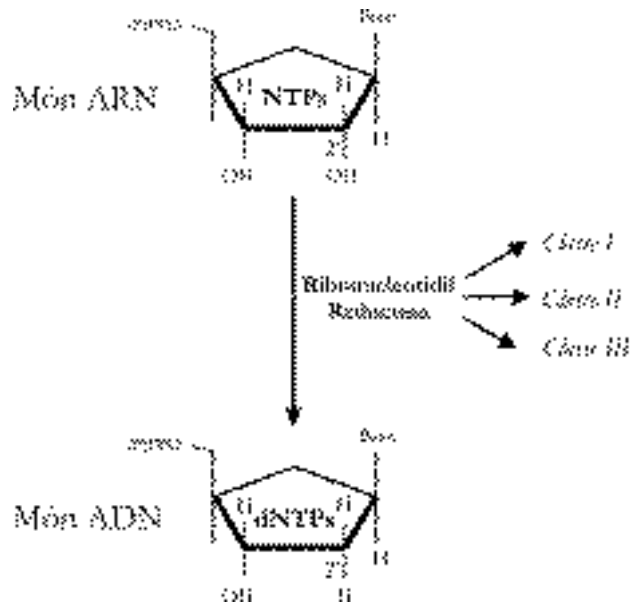


Figura 2. Reducció dels ribonucleòtids a deoxiribonucleòtids.

1.2. L'enzim ribonucleotidil-reductasa

1.3. Antecedents

La història de l'estudi de l'enzim RNR va començar als voltants de 1950, època daurada pel que fa al metabolisme intermediari cel·lular, quan el prof. Peter Reichard i col·laboradors seus injectant ribonucleòsids de pirimidina marcats amb ^{15}N a rates varen descobrir que els ribonucleòsids eren els precursors de les bases de pirimidina (Hammarsten, 1950; Reichard, 1951). Ells van proposar que un enzim era el responsable de la formació irreversible de la desoxiribosa a partir d'una ribosa quan el sucre estava unit a una base de pirimidina. En aquella època una de les preguntes sense resoldre era la síntesi de la desoxiribosa, necessària per a la síntesi del DNA.

Extractes de proteïnes semipurificats d'*Escherichia coli* tenien la capacitat de catalitzar la formació de desoxicitidina-5'-fosfat a partir de la citidina-5'-fosfat. Aquesta reducció requeria ATP i ions de magnesi (Reichard, 1960). Els primers fets que apuntaven a un enzim regulat al·lostèricament van ser obtinguts l'any 1961, quan es van observar efectes estimuladors i inhibitoris en afegir nucleòsids semipurificats a extractes d'embrions de pollastre (Reichard, 1961). Les primeres purificacions

d'aquest enzim en *E. coli* van revelar dos components proteics que van ser anomenats R1 i R2. El substrat per a aquest sistema proteic eren els ribonucleòtids difosfats (Reichard, 1962).

Poc després, l'any 1964, Reichard i col·laboradors seus també van descobrir el sistema de reducció *in vivo* (Laurent, 1964; Moore, 1964), l'especificitat del substrat i les propietats al·lostèriques de l'enzim (Larsson, 1966a i b). Posteriors millores en processos de purificació van donar els components enzimàtics quasi purs (R1 i R2), així es va poder estudiar el complex enzimàtic (R1/R2) i les seves propietats catalítiques (Brown, 1969a, b i c). Actualment, la nomenclatura emprada per descriure ambdues subunitats és R1 per a la subunitat gran i R2 per a la subunitat petita, per a tots els enzims de classe Ia de les diferents espècies (Fontecave, 1992). Anteriorment la nomenclatura era molt confusa ja que un nom diferent a cada subunitat de cada organisme estudiat. Així, teníem que B1 i B2 corresponien a l'enzim d'*E. coli*; M1 i M2, a l'enzim de mamífers i H1 i H2, a l'enzim del virus herpes. La ribonucleotidil reductasa d'*E. coli* va esdevenir el prototip de la classe I.

Posteriorment, un segon tipus de ribonucleotidil reductasa (classe II) va ser descobert en *Lactobacillus leichmannii*, i era estimulada per la S-adenosilcobalamina (AdoCob), la qual cosa suposava una gran diferència amb l'enzim d'*E. coli* (Blakley, 1964). Aquesta va esdevenir el prototip de la classe II.

L'any 1972 Ehrenberg i Reichard van descobrir que la proteïna R2 contenia un radical lliure proteic essencial per a la catàlisi. Aquest treball es va dur a terme estudiant un possible senyal d'EPR (*Electronic Paramagnetic Resonance*) a causa del ferro que conté la subunitat petita, R2 (Ehrenberg, 1972). Era el primer cop que es descobria una proteïna que contenia intrínsecament un radical lliure proteic. Aquest fet va suposar que els estudis de tipus bioquímic i biofísic esdevinguessin clau per al coneixement d'aquests enzims. Diversos estudis en la subunitat gran R1 van permetre determinar que contenia tiols amb activitat reducció/oxidació (Thelander, 1974). Posteriorment es van establir els dos llocs d'unió dels nucleòtids, un per als efectors (regulació al·lostèrica) i un altre per al substrat (centre actiu) (Brown, 1969c; von Döbeln, 1976). Malgrat conèixer bioquímicament l'enzim, encara mancava establir el mecanisme de reacció pel qual era capaç de reduir els ribonucleòtids. No va ser fins a l'any 1980 en què es va proposar una reacció basada en un radical on el substrat actuava com a intermediari en el mecanisme de reacció de l'enzim (Stubbe, 1980).

Gràcies al desenvolupament de les tècniques de biologia molecular va ser possible mapar ambdues subunitats (R1 i R2) en el cromosoma d'*E. coli* (Fuchs, 1976), es va seqüenciar l'operó *nrdAB* que codifica per a les dues subunitats (Carlson, 1984) i la sobreproducció d'ambdues proteïnes (Eriksson, 1977; Platz, 1980; Larsson, 1984)

va ser de gran utilitat, ja que van permetre dur a terme estudis bioquímics i biofísics. El radical proteic va ser localitzat en un residu de tirosina (Sjöberg, 1977 i 1978), concretament a la tirosina 122 de la cadena polipeptídica, tal com es va poder determinar per mutagènesi dirigida (Larsson, 1986). La generació d'aquest radical tirosil va ser àmpliament estudiat per mètodes biofísics (Fontecave, 1992). Les cisteïnes actives involucrades en el trànsit redox de la R1 van ser identificades posteriorment (Åberg, 1989).

La gran revolució dins el món de les ribonucleotidil-reductases es va donar quan a finals dels vuitanta es va trencar el dogma: *un bacteri, una reductasa*. Quan *E. coli* creixia anaeròbicament s'hi va detectar una incorporació de citosina tritiada al DNA. En aquests extractes anaeròbics es va detectar una activitat ribonucleotidil-reductasa, que era fortament estimulada per l'ATP, els ions magnesi i el NADPH (Fontecave, 1989b). Posteriorment es va seqüenciar el seu gen (*nrdD*) (Sun, 1993) i es va demostrar que aquest enzim anaeròbic contenia un radical proteic localitzat en una glicina de l'extrem C-terminal (Mulliez, 1993; Sun, 1996). Aquesta nova RNR va esdevenir el prototip per a la classe III.

Una complicació afegida va ser el descobriment al nostre laboratori d'una altra ribonucleotidil-reductasa en *E. coli*. Complementant un mutant termosensible d'*E. coli* amb una llibreria plasmídica de *Salmonella typhimurium* es va veure que hi havia dos tipus de gens capaços de complementar aquesta mutació. Un tipus eren els ja coneguts *nrdAB*, que codifiquen per la RNR de classe I, ja descrita anteriorment en *E. coli* i l'altre tipus corresponia a uns nous gens anomenats *nrdEF* que codificaven per a una nova classe de RNR (Jordan, 1994a i b). Posteriorment, en estudis realitzats en *Lactococcus lactis* també es va trobar una RNR semblant a la del tipus NrdeF. Així, la classe I es va classificar en classe Ia codificada pels gens *nrdAB* i la classe Ib codificada pels gens *nrdEF* (Jordan, 1996a).

Actualment la seqüenciació completa de diferents genomes bacterians ens ha permès esbrinar les diferents combinacions de Ribonucleotidil-Reductases presents en diferents espècies bacterianes. Trobem bacteris, com ara *Pseudomonas aeruginosa*, que contenen les tres classes d'RNR i, en canvi, altres bacteris que sols en contenen una, com per exemple *Helicobacter pylori*, que només té la classe Ia. L'heterogeneïtat en la distribució de les RNR en un mateix organisme, ens plantejem preguntes, com per què hi ha tantes RNR en un mateix organisme? o, quina relació evolutiva presenten les diferents classes entre sí?

1.4. Les classes

Les RNR conegudes es poden subdividir en tres classes diferents: classe I, II i III (taula I). Aquestes presenten molt poca similitud entre si pel que fa a la seva estructura primària (10-20% d'identitats), encara que realitzen la mateixa reacció catalítica (Sjöberg, 1997; Jordan, 1998). El mecanisme de reacció i la seva regulació al·lostèrica són molt iguals entre elles, i presenten petits detalls que les diferencien. Així, tenim que en totes elles, un radical proteic és l'encarregat d'iniciar la reacció de reducció dels dNTP sent el factor comú per a totes les classes. La classificació es basa en els diferents mecanismes utilitzats per generar el radical proteic, en els cofactors requerits i, en particular, l'estructura i composició de les seves subunitats.

Taula I. Resum de les característiques diferencials de les tres classes de RNR.

	Classe Ia	Classe Ib	Classe II	Classe III
Dependència Oxigen	Aeròbica	Aeròbica	Aeròbica/anaeròbica	Anaeròbica
Estructura	2 2	2 2	(2)	2 2
Gens	<i>ncAB</i>	<i>nrdEF</i>	<i>ncII</i>	<i>nrdDG</i> ^(a)
Radical	Tyr...Cys	Tyr...Cys	AdB12...Cys	AdoMet...Gly...Cys?
Metall	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe	Co	Fe-S
Substrat	NDP	NDP	NDP/NTP	NTP
Reductant	Tioredoxina Glutaredoxina	NrdH-redoxina Glutaredoxina	Tioredoxina	Format
Llocs al·lostèrics/ cadena polipeptídica	2	1	1/2	2
Inhibició dATP	Sí	No	No	Sí
Distribució	Eucariotes Eubacteri Bacteriòfags Virus	Eubacteris	Arqueobacteris Eubacteris Bacteriòfags	Arqueobacteris Eubacteris Bacteriòfags
Prototip	<i>E. coli</i> Mouse	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. léchmannii</i>	<i>E. coli</i>

a) Possiblement la subunitat NrdG actua com una activasa i no formaria part del complex.

Els enzims de classe I es troben en els organismes eucariòtics, virus animals i en alguns bacteris i bacteriòfags. Aquests enzims treballen sota condicions aeròbiques i estan dividits en dues subclasses, Ia i Ib, diferenciades en l'estructura primària i en la regulació al·lostèrica (Jordan, 1994a i b). Els gens *nrdA* i *nrdB* codifiquen per a les proteïnes R1 i R2 de la classe Ia i els gens *nrdE* i *nrdF* codifiquen per a les proteïnes R1E i R1F de la classe Ib, respectivament.

El prototip per a la classe Ia és la reductasa aeròbica d'*E. coli*, la qual ha estat estudiada àmpliament (Fontecave, 1992; Jordan, 1998; Sjöberg, 1997). Aquest enzim requereix oxigen per a la generació del radical proteic (vegeu l'apartat 1.6.2). L'holoenzim està constituït per dos homodímers de les proteïnes R1 i R2 ($\alpha_2 \beta_2$). La proteïna R1 conté el centre actiu de l'enzim i dos tipus de llocs al·lostèrics (lloc al·lostèric d'especificitat i lloc al·lostèric d'activitat). La proteïna petita R2 conté un centre de ferro i el radical tirosil estable. Per generar aquest radical tirosil Tyr122 (numeració per la proteïna R2B d'*E. coli*) es necessiten molècules d'oxigen per unir el centre de ferro, el qual es converteix en un centre difèrric, amb un pont d'oxigen. El radical tirosil està enterrat en l'estructura tridimensional de la proteïna (Nordlund, 1990) i es localitza lluny del centre actiu de l'enzim, situat a la proteïna R1. S'ha proposat, doncs, un mecanisme per connectar el radical tirosil i el centre actiu de l'enzim mitjançant la transferència del radical a través de les cadenes laterals d'aminoàcids (Ekberg, 1996; Ekberg, 1998). Al final d'aquest camí es troba la Cys439 (numeració per la proteïna R1A d'*E. coli*), localitzada en el centre actiu, formant un radical tiil transitori que inicia la reacció catalítica sobre el substrat.

La classe Ib va ser descoberta recentment al nostre laboratori mitjançant la complementació gènica d'una genoteca plasmídica de *Salmonella typhimurium* sobre un mutant condicional per al gen *nrdA* d'*E. coli* (Jordan, 1994a i b). El prototip per a aquesta classe són les proteïnes R1E i R2F de *S. typhimurium*. L'holoenzim està format, de la mateixa manera que en la subclasse Ia, per un homodímer de R1E i de R2F ($\alpha_2 \beta_2$) (Eliasson, 1996). Aquest tipus d'enzim s'ha trobat només en eubacteris, i es desconeix es troba també en altres tipus d'organismes. La seva presència en els enterobacteris és un misteri, i se'n desconeix la funció ja que la RNR que suporta el creixement d'aquests, és la RNR de classe Ia. Hi ha bacteris on aquesta classe Ib suporta el creixement, sent la RNR principal, com és el cas de *Corynebacterium ammoniagenes* (Fieschi, 1998) i *Lactococcus lactis* (Jordan, 1996a). Aquesta classe Ib és la més extensament repartida en el món microbià dels eubacteris (Jordan, 1998). Els enzims d'aquesta classe es diferencien dels de la classe Ia perquè en la seva seqüència primària hi manquen aproximadament uns 100 aminoàcids de l'extrem N-terminal de la subunitat gran. Aquesta part correspon al lloc al·lostèric que regula l'activitat general de l'enzim. Això fa que els enzims de la classe Ib no siguin inhibits pel dATP com passa en els enzims de classe Ia (Eliasson, 1996). Una altra diferència entre ambdues subclasses la trobem en la utilització dels reductants externs. Trobem que la classe Ia utilitza el sistema de les Trx i Grx, i la classe Ib utilitza el seu propi reductant codificat en el mateix operó, la NrdH-redoxina (Jordan, 1996a). Ambdues subclasses de RNR utilitzen ribonucleòtids difosfat com a substrats.

La RNR de classe Ia de ratolí també ha estat estudiada extensament tal com es revisa en (Thelander, 1994).

L'estructura tridimensional de les proteïnes de la classe Ia (R1 i R2) d'*E. coli* (Nordlund, 1990., Uhlin, 1994., Sjöberg, 1994), de la proteïna R2 de ratolí (Kauppi, 1996), i de la proteïna R2F de *S. typhimurium* (Eriksson, 1998b) ha estat determinada i es descriurà a l'apartat 1.7.

Els enzims de classe II es troben en bacteris, tant en eubacteris com en arqueobacteris, i en dues espècies d'eucariotes, el flagel·lat *Euglena gracilis* i el fong *Pithomyces chartarum* (Harder, 1993). Aquests enzims tenen la capacitat de funcionar tant en condicions aeròbiques com anaeròbiques. El gen que codifica per a aquesta classe és l'*nrdJ*. La característica principal d'aquests enzims és el requeriment del cofactor S-adenosilcobalamina (vitamina B₁₂) (AdoCob) per a la generació del radical proteic. El prototip per a aquesta classe ha estat des de fa molt de temps l'enzim de *Lactobacillus leichmannii* (Panagou, 1972; Licht, 1996). Aquest enzim redueix ribonucleòtids trifosfat i es comprova que la seva estructura, monomèrica (), és més simple que la dels enzims de classe I (Panagou, 1972). Recentment s'han caracteritzat més enzims d'aquesta classe en diverses espècies bacterianes amb una estructura proteica primària diferent de la de *L. leichmannii*, amb una estructura enzimàtica que pot ser tant monomèrica com homodimèrica (o ₂) i que poden utilitzar, segons els casos ribonucleòtids trifosfat o difosfat (Riera, 1997; Tauer, 1997; Eliasson, 1999). El poder reductor per a aquesta classe ve donat per les Trx de la mateixa manera que en la classe Ia. La proteïna NRdJ presenta els llocs al·lostèrics i el centre actiu de l'enzim.

El tercer tipus d'RNR està representat per les RNR de classe III. Aquestes només es troben en el món microbià, tant en eubacteris com en arqueobacteris. Aquesta RNR es caracteritza pel fet que requereix una anaerobiosi estricta pel seu funcionament, per tant, es descriu com la ribonucleotidil reductasa anaeròbica. El representant més estudiat és la RNR de classe III d'*Escherichia coli*, codificada pels gens *nrdD* i *nrdG* (Sun, 1993 i 1995). La proteïna NrdD és la que té el centre actiu i els llocs de regulació al·lostèrica de l'enzim (Eliasson, 1994). La proteïna NrdD conté el radical proteic, que en aquest cas és un radical glicil (Sun, 1996). La proteïna NrdG (anomenada també activasa) és una proteïna petita (al voltant de 155 aminoàcids) que conté un *cluster* de ferro i sofre (Sun, 1995). Aquesta NrdG-activasa junt amb la S-adenosilmetionina (AdoMet) són els encarregats de generar el radical proteic en la glicina situada en la proteïna NrdD (Harder, 1992). Es creu que l'holoenzim d'aquesta classe està format per un complex de dos homodímers d'ambdues proteïnes (NrdD:NrdG, ₂ ₂) (Ollagnier, 1996) encara que estudis en altres RNR

de classe III revelen que no hi ha aquesta associació entre la proteïna NrdD i la proteïna NrdG (Tamarit, 1999). La flavodoxin reductasa i la flavodoxina (Bianchi, 1993a i b) estan involucrades en la reducció de la proteïna NrdG després de la seva activació amb la S-adenosilmetionina. La proteïna NrdD activada, o sigui amb el radical glicil, pot dur a terme molts cicles catalítics per reduir ribonucleòtids. El donador d'hidrògens per a aquesta classe és el format, (Mulliez, 1995) en lloc dels grups ditiols presents en la Trx i la Grx. Els nucleòtids trifosfats són els substrats que utilitza aquesta classe d'enzims (Fontecave, 1989b).

Tots els components presents en el sistema de la ribonucleotidil reductasa anaeròbica estan altament relacionats amb el sistema central del metabolisme anaeròbic: la piruvat format liasa (PFL) (Knappe, 1990; Wagner, 1992).

Els enzims pertanyents a aquesta classe es creu que són les formes més primitives de les diferents classes d'RNR ja que l'origen de la vida a la Terra es va donar en unes condicions ambientals d'absència d'oxigen (Reichard, 1997). Aquesta anaerobiosi estricta és la que requereix l'enzim de classe III pel seu funcionament en la reducció dels ribonucleòtids.

1.5. La regulació al·lostèrica

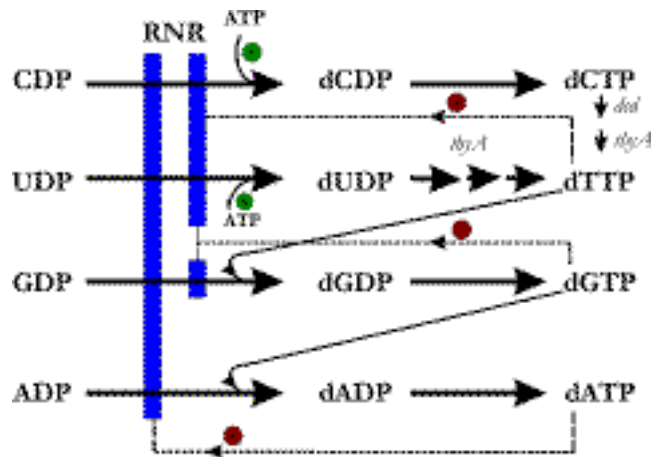
Una de les característiques principals de les Ribonucleotidil-Reductases és la regulació al·lostèrica que presenten. Aquestes interaccionen amb efectors positius i negatius, i presenten llocs d'unió per a aquests topològicament diferents del centre actiu de la subunitat gran. Les RNR utilitzen quatre substrats diferents, corresponents a les quatre bases de les quals està constituït el DNA, per tant, això implica una regulació al·lostèrica complexa per a la reducció equilibrada dels diferents substrats (per a revisió Jordan, 1998). Un model d'aquesta regulació és la RNR de la classe Ia. En aquesta classe el lloc de regulació general de l'activitat de l'enzim determinen si aquest és actiu o inactiu. Aquest lloc al·lostèric que regula l'activitat general de l'enzim també s'anomena lloc de baixa afinitat, ja que el dATP s'hi uneix amb baixa afinitat.

La regulació de l'especificitat de substrat és similar per a totes les classes de RNR (figura 3). Els substrats representats en aquesta figura són ribonucleòtids trifosfat (per a les classes II i III) però poden ser ribonucleòtids difosfat (classes I i II). En la utilització dels ribonucleòtids trifosfat es requereix una fosforilació prèvia dels ribonucleòtids difosfat per a una regulació al·lostèrica eficaç.

Com es mostra a la figura 3, la unió de l'ATP i del dATP al lloc d'especificitat del substrat indueix la reducció del CTP i de l'UTP. La unió del dTTP indueix la

reducció del GTP i la unió del dGTP indueix la reducció de l'ATP. Baixes concentracions de dATP en la cèl·lula provoquen la reducció de pirimidines mentre que altes concentracions inactiven l'enzim, ja que aquest s'uneix al lloc que controla l'activitat general de l'enzim.

Figura 3. Regulació al·lostèrica general de les RNR. Els cercles verds indiquen estimulació de la reacció i els cercles vermells, inhibició de la reacció.



S'ha comentat que les RNR són enzims essencials per a la cèl·lula ja que proporcionen els desoxiribonucleòtids per sintetitzar el DNA. Si el *pool* de nucleòtids no es manté equilibrat es pot produir la incorporació incorrecta dels dNTP en el DNA i es crearien mutacions (Kunz, 1991). Per aquesta raó és molt important una regulació precisa en l'activitat general d'aquests enzims.

1.6. Mecanismes catalítics

1.6.1. Donadors d'electrons fisiològics

Les tioredoxines (Trx) i glutaredoxines (Grx) són proteïnes petites amb un centre actiu ditiol/disulfur amb activitat *redox* que funcionen com a proteïnes reductores de disulfurs. Són extremament multifuncionals i ubiques, amb funcions molt importants dins el metabolisme cel·lular, i es troben en tots els organismes, des de l'home fins als procarïotes (Gleason, 1988; Holmgren, 1985., 1989; Åslund 1999). La funció principal, descoberta per la Trx d'*E. coli*, és la de ser el donador

d'hidrògens per a la RNR. Aquesta funció va ser descoberta al laboratori del prof. Peter Reichard al voltant dels anys seixanta (Laurent, 1964; Moore, 1964). La Grx va ser descoberta en mutants d'*E. coli* que no expressaven la tioredoxina i depenien de glutatió (GSH) (Holmgren, 1976). Les RNR no són enzims suïcides; així, les cisteïnes involucrades en el procés de reducció localitzades en el centre actiu han de ser reduïdes de nou, amb la qual cosa es regenera el seu poder reductor, per què l'enzim pugui participar en un altre cicle de reacció. Cal, doncs, un agent reductor ditiòlic que funcioni com a donador d'hidrògens per a les RNR. Aquests es troben presents en les Trx i les Grx.

En *E. coli* la proteïna R1 conté dues cisteïnes en el centre actiu que actuen com a centres redox que s'oxiden a disulfit durant la catàlisi. Són necessaris dos hidrògens per reduir un ribonucleòtid (ADP, GDP, GDP i UDP) que deriven de les dues cisteïnes del centre actiu (Cys225 i Cys462) (Thelander, 1974; Åberg, 1989; Mao, 1992). El que sorprèn quan mirem l'estructura tridimensional de la proteïna R1 d'*E. coli*, és la gran inaccessibilitat de les Trx i Grx al centre actiu (Uhlen, 1994). Hi ha dues cisteïnes a la part C-terminal de la proteïna, Cys754 i Cys759 (numeració de la R1 d'*E. coli*) amb activitat redox on actuen d'intermediàries entre els donadors d'electrons i les cisteïnes del centre actiu. Aquestes cisteïnes de l'extrem C-terminal es poden acostar al centre actiu a causa de la gran mobilitat d'aquesta zona de la proteïna (Lin, 1987; Åberg, 1989; Mao, 1992; Uhlin, 1994). En aquesta zona C-terminal de la proteïna és on les Trx i les Grx interaccionen actuant com a donadors d'electrons per a les RNR. Les tioredoxines oxidades són reduïdes per les tioredoxines reductases. El sistema emprat per les glutaredoxines implica el glutatió (-glutamil-cisteïnil-glicina) i la glutatió reductasa. En ambdós casos el donador terminal d'hidrògens és el NADPH. La ruta que segueixen els electrons des del NADPH fins a la reducció dels ribonucleòtids *via* Trx o Grx es mostra a la figura 4.

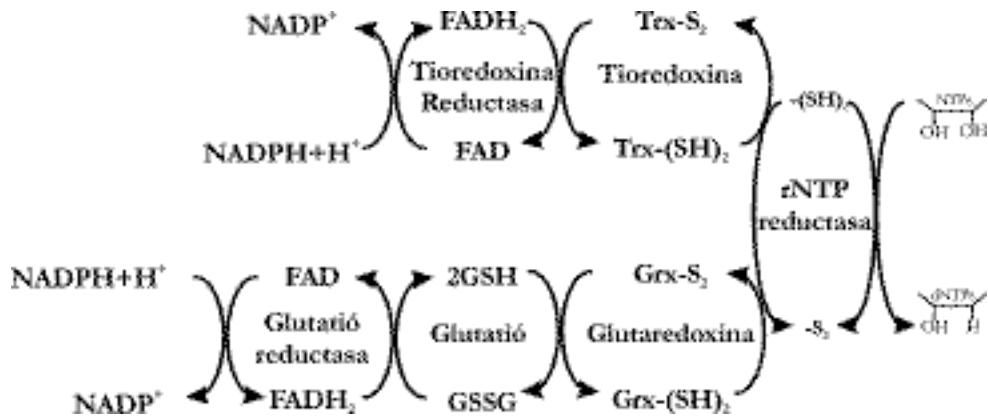


Figura 4. Regeneració del sistema dels donadors d'hidrògens per a la RNR aeròbica d'*E. coli*.

Així. Doncs, tenim que les RNR estudiades que utilitzen aquests reductors fisiològics, oxiden un mol de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ per cada mol de dNTP produït. La reducció de les cisteïnes del centre actiu de les RNR pot ser duta a terme *in vitro* directament per petites molècules ditiòliques, com el ditiotereitol (DTT) o dihidrolipoat reduït. Les molècules monotiòliques com el mercaptoetanol i el glutatió no són capaços de fer-ho (Reichard, 1962).

A totes les proteïnes amb activitat redox existeixen sempre dues cisteïnes que es troben en un centre actiu del tipus $\text{Cys}(\text{SH})\text{-x-x-Cys}(\text{SH})$. En la seva forma oxidada formen un pont disulfur. El centre actiu de les Trx és sempre Cys-Gly-Pro-Cys, mentre que per a les Grx és majoritàriament Cys-Pro-Tyr-Cys. La Trx d'*E. coli* formada per 108 aa i amb un pes d'11.7 kDa, està codificada pel gen *trxA* (Lim, 1985). El gen *grx* codifica per a la Grx1 de 85 aa i 9.7 kDa (Höög, 1986).

La primera sospita que en *E. coli* hi havia un altre sistema redox, addicional al trobat fins aleshores, va venir donada pel fet que un doble mutant defectiu al mateix temps per a la Trx (*trxA*) i la Grx1 (*grx*) era viable. A més a més, es va veure que aquest sistema addicional havia de ser del tipus Grx (dependent de glutatió), ja que un doble mutant per a la Trx i per a la glutatió reductasa (*gor*) no era viable. A partir d'aquest punt es van descobrir en *E. coli* dues Grx addicionals (Grx2 i Grx3). La Grx2 (27 kDa) no actua com a donador d'hidrògens per a la RNR. La Grx3 (10 kDa) sí que presenta una activitat reductora, tot i que baixa, sobre la RNR, però suficient per permetre la síntesi dels dNTP en el doble mutant *trxA grx* (Åslund,

1994). Recentment, gràcies a la seqüenciació del genoma d'*E. coli*, s'ha pogut descobrir un altre gen que codifica per a una altra Trx. La Trx2 (139 aa i 15.5 kDa) té capacitat d'actuar com a donador d'electrons per a la classe Ia, i es troba en cèl·lules d'*E. coli* en condicions normals de creixement (Miranda-Vizuet, 1997).

La classe Ib no utilitza ni la Trx ni les Grx com a reductor, malgrat això, utilitza una glutaredoxina-*like* anomenada proteïna NrdH (72 aa i 9 kDa), que és reduïda per la tioredoxina reductasa i no pel glutatió (Jordan, 1997a). Aquesta proteïna codificada pel gen *nrdH*, es troba en el mateix operó que conté els gens *nrdE* i *nrdF* que codifiquen per a les subunitats R1E i R1F del sistema de les RNR de classe Ib.

Les RNR de classe II utilitzen solament el sistema de les tioredoxines. En la seqüència primària d'aquesta classe, les dues cisteïnes del centre actiu es troben alineades en la mateixa posició que en la classe I. També trobem que en la part C-terminal hi ha una sèrie de Cys que poden actuar com els acceptors dels hidrògens provinents de les Trx.

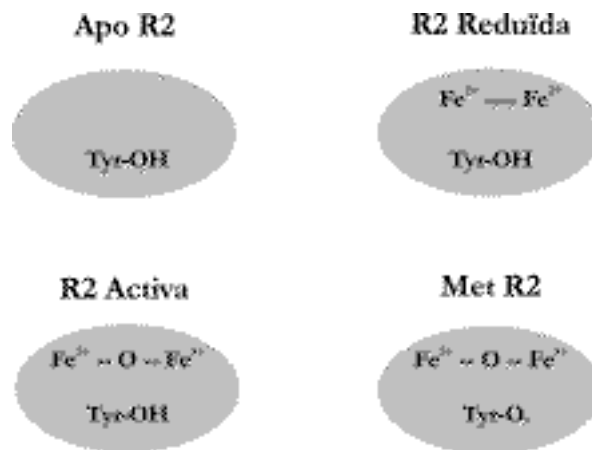
Finalment, les RNR anaeròbiques de classe III utilitzen un mecanisme completament diferent per rebre el poder reductor. En lloc de les Trx i Grx aquests utilitzen com a font d'hidrogen el format (Mulliez, 1995). En els darrers anys es negava el fet que les Trx i Grx cel·lulars poguessin actuar en la classe III, però recentment s'ha observat que la Trx pot substituir el DTT durant l'activació de la classe III, a través de la reducció de les dues Cys que es troben a la part C-terminal d'aquestes proteïnes. D'aquesta manera es resol el paper del possible substitut fisiològic del DTT en la reacció (Padovani, 2001).

1.6.2. Generació del radical i estabilitat

La generació del radical tirosil i el centre de ferro dinuclear s'han estudiat extensament en la RNR de classe Ia. Al voltant dels anys setanta es va mostrar per primera vegada que amb l'addició de ferro en estat ferrós a la proteïna R2B nadiva (apo-R2) generava la forma activa (Atkin, 1973). Per a aquest procés cal oxigen molecular (Pettersson, 1980). La proteïna R2B pot existir almenys en quatre formes diferents: apo, reduïda, met i en la forma activa, segons l'estat del seu centre de ferro dinuclear i el seu radical (figura 5). La forma activa de la proteïna R2B conté un centre difèrric centrat i unit per un pont μ -oxo adjacent al radical tirosil estable. La

forma apo no conté cap ió de ferro i la forma reduïda conté un centre diferrós. Finalment, la forma met, la més semblant a la forma R2B activa s'obté per la reducció d'un electró de la forma activa i conté un centre difèrric, on el pont μ -oxo connecta els dos ions de ferro, però no el radical tirosil (figura 13) (Sjöberg, 1997). El radical tirosil pot ser reduït de manera espontània per l'acció d'electrons reductants senzills (o per la hidroxidreurea), la qual cosa dóna un centre de ferro dinuclear en estat difèrric amb un residu de tirosina no oxidat, i s'obté la forma met. La forma reduïda es pot generar per la unió d'ions ferrosos a la forma apo o per la reducció directa del centre de ferro dinuclear.

Figura 5. Diferents formes de la proteïna R2 en relació amb el radical proteic i el centre de ferro dinuclear.



La regeneració del centre difèrric es du a terme *in vivo* mitjançant un sistema enzimàtic que implica les flavin reductases en *E. coli* (Eliasson, 1986; Fontecave, 1987 i 1989a). El radical es genera en la forma reduïda del cluster de ferro mitjançant l'activació per l'oxigen molecular. En la reducció dels NTP calen quatre electrons: dos vénen del centre metàl·lic, un altre prové de la Tyr122 i en situacions *in vivo*, l'últim electró prové, probablement, del ferro lliure no unit a la proteïna, encara que aquesta hipòtesi no està del tot comprovada (Ochiai, 1990; Bollinger, 1991). Tots aquests estudis conclouen en l'equació general següent per a la generació del radical tirosil en la classe Ia (figura 6).

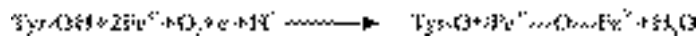
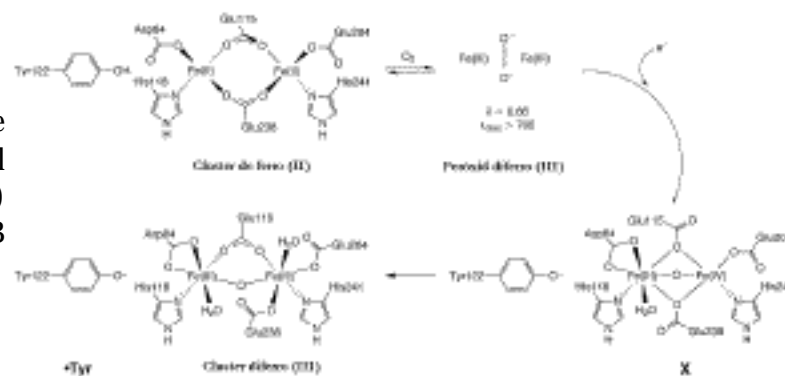


Figura 6. Esquema general de la formació del radical tirosil. Tyr-OH i Tyr-O es localitzen a la posició 122 de la cadena polipeptídica R2. El cluster $\text{Fe}^{3+}\text{---O---Fe}^{3+}$ s'uneix a la proteïna R2 activa.

La formació del radical ha estat estudiada detalladament per diferents grups durant els anys noranta utilitzant diverses tècniques espectroscòpiques com *rapid freeze quench*, EPR, i espectroscòpies Mössbauer i ENDOR (Andersson, 1999; Bollinger, 1991 i 1998; Sturgeon, 1996). El mecanisme que es proposa per a la generació del radical en la classe I es resumeix a la figura 7.

Figura 7. Mecanisme per a la generació del radical proteic (Tyr122) en la subunitat R2B d'*E. coli*.



El primer pas implica la unió d'ions de ferro per donar la forma reduïda. El pas següent és la unió de l'oxigen molecular al lloc difèrric. En aquest punt es produeix la reducció de dos electrons per donar espècies peroxo difèrriques. Seguidament es produeix el guany d'un electró i un protó que es creu que ve donat *via* la transferència del radical. Tot això comporta la formació d'un pont μ -oxo entre les espècies ferril, anomenades espècies X. En l'últim pas, la formació del radical tirosil, hi ha la transferència d'un electró i un protó des de la Tyr122 al centre de ferro i es dona per acabada la generació de la forma activa de R2.

En les RNR de classe II no s'ha observat cap radical proteic estable. La catàlisi s'inicia amb el trencament homolític del cofactor AdoCob, el qual genera un radical transitori que serà el que es transferirà a les cisteïnes del centre actiu (Stubbe, 1998).

En els enzims de classe III la situació es més complexa ja que la generació del radical es fa en una glicina situada a l'extrem C-terminal de la proteïna NrdD, i requereix una proteïna activadora específica, la qual conté un centre 4Fe-4S d'aquesta (Tamarit, 1999). Aquest mecanisme es descriurà àmpliament en l'apartat 1.9.

1.6.3. Transferència del radical

Tots els estudis duts a terme en aquest sentit s'han realitzat prenent com a model la RNR de classe Ia d'*E. coli*. Es creia que el radical proteic, situat en la proteïna R2, interactuava directament amb el substrat que se situava en la proteïna R1. En resoldre's l'estructura tridimensional de la proteïna R2 (Nordlund, 1990) es va veure clarament que el radical estava enterrat dintre de la proteïna, a més de 10 Å de la superfície, dins d'una butxaca totalment hidrofòbica. Posteriorment es va veure la gran importància d'aquest entorn hidrofòbic, ja que permet mantenir de manera estable el radical proteic (Ormö, 1995) fent que sigui del tot impossible que aquest interaccioni directament amb el substrat. En l'estructura tridimensional, Nordlund i Eklund van observar una llarga cadena de transport d'electrons que connecta el radical tirosil amb la superfície (Nordlund, 1993). Van proposar que la transferència d'aquest radical des de la proteïna R2 vindria donada a través de ponts d'hidrogen. Aquesta cadena de transport d'electrons està formada per una sèrie d'aminoàcids totalment conservats entre les diferents seqüències de R2, que van des del radical tirosil Tyr122 cap a l'Asp84, després cap a un dels àtoms de ferro, cap a l'His118, l'Asp237 i, finalment, cap al Trp48 (figura 8). Els últims 32 aminoàcids no són visibles en les dades cristal·logràfiques atesa la gran mobilitat d'aquesta regió. L'estructura de la proteïna R2 constitueix un 70% d'hèlix i tan sols una fulla antiparal·lela. Tots els residus involucrats en la transferència del radical es troben localitzats en les hèlixs de la proteïna (vegeu l'apartat 1.7.1.2 de la introducció). La Tyr356 de la proteïna R2 sembla ser el nexa d'unió entre aquesta proteïna i la subunitat gran R1. L'any 1994, Uhlin i Eklund varen cristal·litzar la proteïna R1 amb un pèptid corresponent a la part C-terminal de la proteïna R2, responsable de la unió d'ambdues subunitats (Uhlin, 1994; Ekberg, 1996).

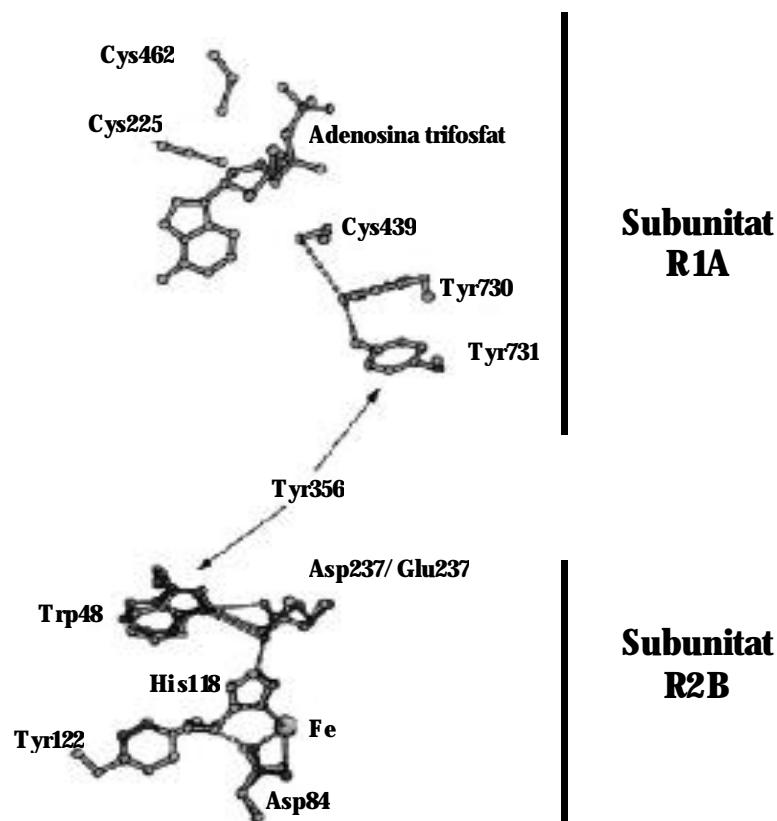


Figura 8. Sistema de transferència del radical tirosil.

Aquests autors van apuntar la importància de dues tirosines (Tyr730 i Tyr731), que es troben a una distància raonable que els permet formar ponts d'hidrogen entre elles i entre la Cys439 del centre actiu de la proteïna R1 (figura 8). Tots aquests residus han estat alterats per mutagènesi dirigida i s'ha pogut corroborar la seva importància en el sistema de transferència del radical.

1.6.4. Mecanisme de reacció

El mecanisme de reacció dut a terme en el lloc actiu de les RNR ha estat molt estudiat en els darrers anys per diferents grups de recerca, per raó de la peculiaritat que presenta (figura 9). La transferència del radical des de la Tyr122 de la proteïna R2 fins a la Cys439 de la proteïna R1 del lloc actiu inicia un cicle invers en la reacció. Així, quan el substrat es redueix, el radical es transfereix enrere al lloc original, situat de nou en la proteïna R2.

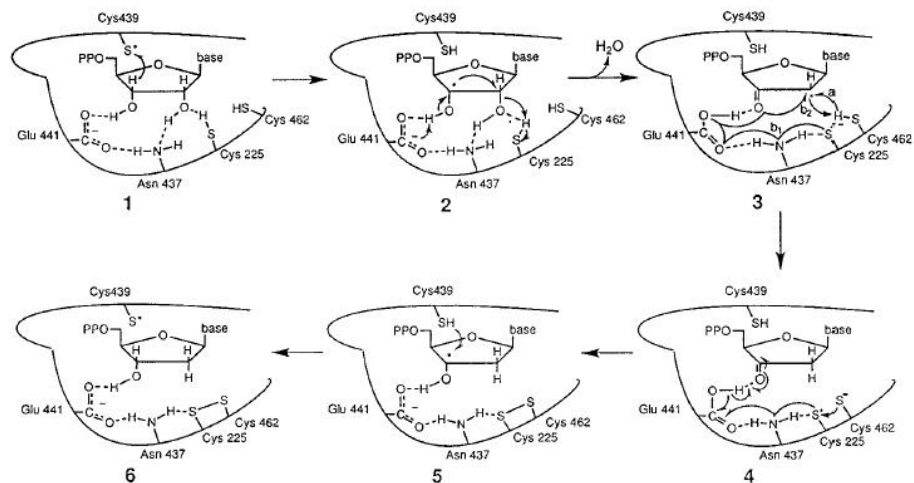


Figura 9. Mecanisme de reacció de consens per la reducció dels ribonucleòtids (segons Persson, 1997).

El primer pas catalític es produeix després de la unió del substrat al centre actiu, més tard hi ha la transferència del radical des de la R2 cap a la Cys439. Aquest fet provoca que hi hagi l'extracció de l'hidrogen de l'extrem 3' del substrat pel radical tiil esporàdic creat en la Cys439 (Stubbe, 1980 i 1998). En aquest pas es forma un radical transitori en el substrat. En el pas següent hi ha una protonació de l'hidroxil 2' amb la pèrdua subsegüent d'una molècula d'aigua. En aquest pas intervien residus molt conservats del centre actiu com són ara l'Asn437 i el Glu441. La formació d'un pont disulfur entre les dues cisteïnes conservades del centre actiu (Cys225 i Cys462) se suposa que succeeix mitjançant la transferència d'un àtom d'hidrogen a la posició 2' del substrat. Això permet la formació d'un radical disulfid. Posteriorment, un electró addicional es transfereix des del radical disulfid a l'oxigen de la posició 3' del substrat. S'ha proposat que aquest pas ve mediat per residus conservats del centre actiu com l'Asn437 i el Glu441 (Eriksson, 1997). En l'últim pas, hi ha la transferència d'un electró i d'un àtom d'hidrogen des de la Cys439 a la posició 3' del substrat, i es produeix la regeneració del radical temporal tiil al residu Cys439.

1.7. Classe I

Aquesta és la classe que fins al moment s'ha estudiat més extensament i, com ja s'ha dit, es divideix en dues subclasses: Ia i Ib. Les RNR d'aquesta classe estan formades per dues subunitats homodimèriques no idèntiques anomenades R1A i R2B per a la

classe Ia (codificada pels gens *nrdAB*) i R1E i R2F per a la classe Ib (codificada pels gens *nrdEF*) (figura 10).

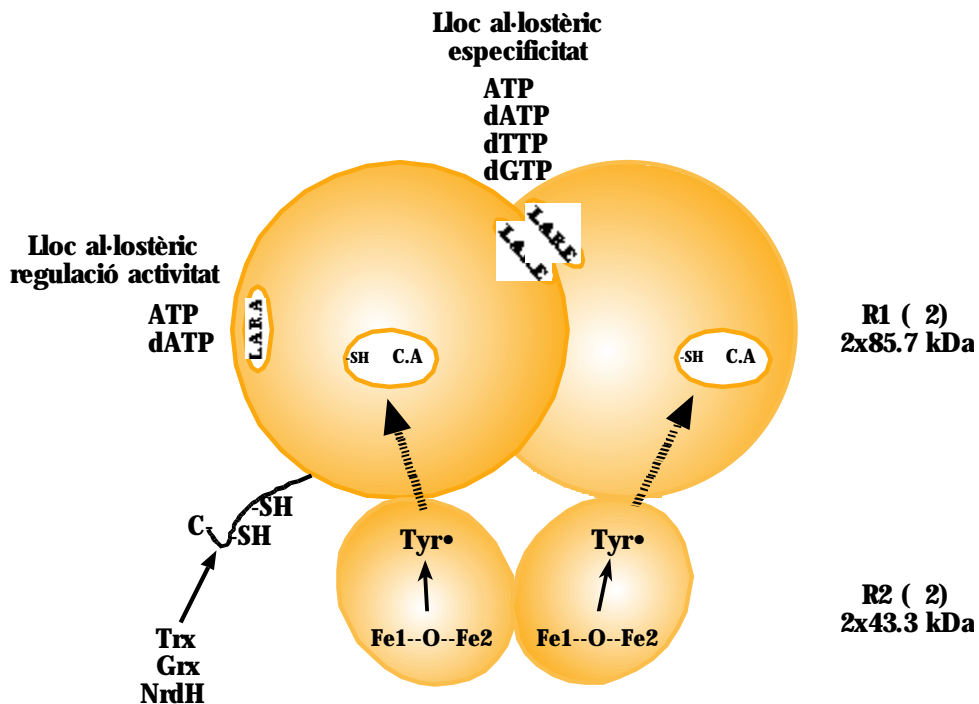


Figura 10. Model esquemàtic de la Ribonucleotidil-Reductasa de classe I.

La proteïna R1 conté el centre actiu, amb les cisteïnes amb activitat redox i dos llocs al·lostèrics diferents: el lloc al·lostèric que regula l'especificitat i el de l'activitat general de l'enzim. El lloc al·lostèric per a la regulació de l'especificitat es localitza entre els dos monòmers R1, i es comparteix aquest lloc entre les dues subunitats. La forma activa del monòmer R2 conté dos centres de ferro i dos radicals tirosils estables, un per cada cadena polipeptídica. El radical en la R2 és necessari per a la reacció dependent de radical que es du a terme en el centre actiu del monòmer R1.

1.7.1. Classe Ia procariòtica

La classe Ia d'*E. coli* és la millor caracteritzada i l'estudiada amb més detall. Tal com es comentarà més àmpliament en l'apartat de distribució de les RNR (apartat 1.11), aquesta es troba representada en quasi tots el grups de bacteris.

1.7.1.1 Estructura de la subunitat R1A

L'homodímer gran (R1), amb 761 residus i amb un pes molecular de 171 kDa, (codificat pel gen *nrdA*) és l'encarregat de dur a terme la catàlisi i la regulació al·lostèrica de l'enzim.

L'estructura del dímer R1 en *E. coli* va ser determinada a una resolució de 2.5 Å (Uhlín, 1994). Cada monòmer està constituït per tres dominis diferents: un domini majoritàriament amb α -hèlix que comprèn els primers 220 aa de la part N-terminal; un segon domini de 480 aa que constitueix un nou tipus estructural, format per 10 cadenes α i 8 cadenes β disposades antiparal·lelament que donen lloc a un barril α/β , i, finalment, trobem en la part terminal un domini petit format per 70 aa amb estructura α/β . El barril central està compost per dues meitats disposades de forma antiparal·lela, cadascuna composta amb 5 fulles β paral·leles connectades entre si per 4 α -hèlixs. Les dues meitats estan connectades per un llarg llaç en forma de dit (*finger-loop*). A causa de la gran semblança que hi ha entre les dues meitats s'ha postulat que potser provenen d'una duplicació gènica ancestral.

1.7.1.1.1. El centre actiu

El centre actiu va ser identificat mitjançant un complex R1-GDP (Eriksson, 1997). Es localitza enmig d'una esclatxa entre el domini N-terminal i el barril i per sobre del *finger-loop*. Les cisteïnes amb activitat redox (Cys225 i Cys462) involucrades en la reducció de la ribosa, estan localitzades en un dels dos connectors que hi ha entre les dues meitats del barril. Encara que aquestes dues cisteïnes es trobin separades uns 237 aa l'una respecte de l'altra, queden tan properes entre elles que poden formar un pont disulfur.

La tercera cisteïna important en la catàlisi, la Cys439, responsable de formar el radical tiil transitori necessari per a la catàlisi (Licht, 1996), es localitza a la part superior del *finger-loop*, que s'introdueix cap a la part central del barril on hi ha les altres dues cisteïnes. Durant la reducció del pont disulfur que hi ha entre les dues cisteïnes (Cys225 i Cys462), la Cys439 es mou aproximadament 6 Å cap a l'interior de la proteïna, la qual cosa permet la unió del substrat. La forma oxidada del pont disulfur té accés per la part del darrere del centre actiu. El grup difosfat present en el substrat s'uneix al fons de l'esclatxa del centre actiu. L'anell de ribosa del substrat

s'orienta d'una banda, entre les cisteïnes amb activitat redox (Cys225 i Cys462) i, per l'altra, entre el radical tiil de la Cys439.

Com que el centre actiu és molt estret i es troba enfonsat en l'estructura de la proteïna és impossible que les proteïnes amb capacitat redox com les Trx i Grx puguin arribar a les cisteïnes del centre actiu. Un segon parell de cisteïnes amb activitat redox (Cys754 i Cys759), situades a l'extrem C-terminal, reben els electrons del donadors d'hidrogen externs i a causa de la gran mobilitat d'aquesta part de la proteïna, poden transferir els electrons al lloc catalític (centre actiu) (Ekberg, 1996).

1.7.1.1.2. Llocs al·lostèrics

L'estructura del dos llocs al·lostèrics va ser establerta acomplexant els efectors al·lostèrics a la proteïna R1 (Eriksson, 1997). Els dos efectors utilitzats en el treball cristal·logràfic foren l'AMPPNP (anàleg a l'ATP), que s'uneix al lloc al·lostèric que regula l'activitat general del enzim, i el dTTP, que s'uneix al lloc al·lostèric que governa l'especificitat de l'enzim.

El lloc al·lostèric general de l'activitat (L.A.R.A) *activity site* es troba situat a la part superior de l'esclètxa de la part N-terminal de la proteïna R1, amb la base unida a una butxaca molt hidrofòbica mitjançant ponts d'hidrogen. La Val7 i Ile58 se situen a una banda de l'AMPPNP i la Ile22 a l'altra banda de la ribosa. Les cadenes principals dels residus 16 a 18 formarien ponts d'hidrogen específics amb la base. La His59 es troba a prop de la ribosa possiblement interactuant amb l'extrem 3'-hidroxil. La ribosa està unida per la part superior a la Val25. Els fosfats es troben units a residus carregats positivament: Lys9, Arg10, Lys21 i Lys91.

En el model descrit per a la interacció R1:R2, el lloc al·lostèric de l'activitat general de la R1A es troba a prop de l'extrem C-terminal de la proteïna R2, la qual cosa influeix en les posicions relatives de les proteïnes R1 i R2. D'aquesta manera es pot afectar la transferència del radical que va des de R2 cap al centre actiu.

El lloc al·lostèric de l'especificitat (L.R.A.E) *specificity site* està situat en la interfase entre les dues subunitats de la proteïna R1A.

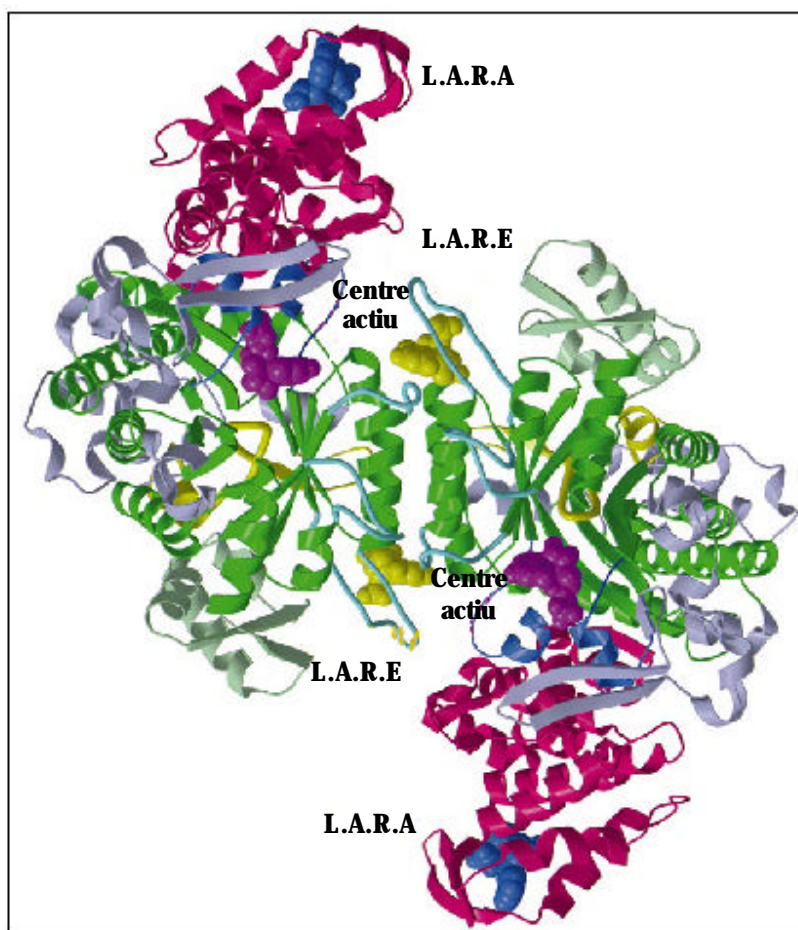


Figura 11. Estructura proteica de la RNR de classe Ia d' *E. coli* (segons Eriksson, 1997).

El dTTP s'uneix a través dels seus grups fosfats al llarg del lloc on es produeix la interacció entre les dues R1A, unint-se a l' α -hèlix de la part N-terminal d'un monòmer, i la timidina es situa a prop de l'extrem C-terminal de dues β -hèlixs de l'altre monòmer. La base s'uneix a la part superior de 4 β -hèlixs, essent els residus importants en aquesta unió l'Arg262 i l'Asp232. L'Arg262 s'uneix als β -fosfats mentre que l'Asp232 coordina l'extrem 3'-hidroxil de la base. La distància entre aquest lloc al·lostèric i el centre actiu (on hi ha el substrat) és d'uns 15 Å, distància molt gran per permetre una interacció directa. Això no obstant, els efectors el que fan és establir tres *loops* que són molt flexibles en la proteïna sense lligant. Una d'elles realitza l'estabilització del lloc d'unió al substrat. Hi ha una forta interacció entre l'efector i el *loop* 1, i entre aquest i els residus Arg262, Ile268 i Arg269. La

Cys292 del *loop 2* és l'únic residu de l'altra subunitat que interacciona amb l'efector. La posició de l'efector està a la interfase entre les proteïnes R1; d'aquesta manera es reforça la idea que la unió dels efectors estabilitza la formació del dímer R1 (Thelander, 1980).

1.7.1.2 Estructura de la subunitat R2B

La determinació de l'estructura de la proteïna R2B va suposar un avenç molt important, ja que no només ens donava per primer cop informació sobre l'estructura d'un monòmer de les RNR, sinó que també va resoldre l'estructura i la funció del centre de ferro dinuclear, la generació del radical tirosil i la seva transferència cap al centre actiu (Nordlund, 1990).

Una altra troballa molt interessant fou que la Tyr122, responsable del radical estable de l'enzim (Sjöberg, 1978), estava enfonsada dins de la proteïna en una butxaca extremament hidrofòbica i molt propera al centre de ferro dinuclear. El radical tirosil no pot participar de manera directa en les reaccions químiques dutes a terme en el centre actiu, per tant, s'ha de generar un radical temporal en la subunitat R1. Tal com ja s'ha descrit en un punt anterior, a la introducció (vegeu l'apartat 1.6.3), ja s'han determinat els residus involucrats en aquesta transferència.

La proteïna R2 consisteix en 8 α -hèlixs molt llargues orientades paral·lelament i compactades entre si i 4 β -hèlixs més curtes perpendiculars a la direcció de les α -hèlixs més llargues. L'estructura de la R2 d'*E. coli* conté, a més a més, dues fulles que, junt amb les altres dues de l'altra subunitat, formen quatre fulles (figura 12). El centre de ferro dinuclear i el radical tirosil se situa dins de 4 de les α -hèlixs llargues en el centre de la subunitat, i formen una pseudoestructura de simetria 2. Aquesta simetria entre els dos parells d' α -hèlixs també es mostren de manera seqüencial a la posició dels residus implicats en lligar els àtoms de ferro. Així, tenim que l'Asp84 d'una α -hèlix i el Glu115 i His118 de l'altra α -hèlix estan relacionades amb el Glu204 d'una β -hèlix i el Glu238 i His241 de l'altra β -hèlix, respectivament (figura 13).

El centre de ferro dinuclear es troba obert i esdevé accessible al dioxigen, un prerrequisit per a la generació del radical en el residu veí Tyr122. El radical

s'emmagatzema en el residu Tyr122 a prop de l'Asp84, envoltada de molts residus hidrofòbics.



Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura tridimensional de la proteïna R2B (segons Kaupi, 1996).

Per tant, el centre de ferro dinuclear està constituït per dos ions de Fe^{3+} . Els ions Fe^{3+} , anomenats Fe1 i Fe2, estan lligats per 2 i 3 residus carboxilats (Asp84 i Glu115, Glu115, Glu204 i Glu238) respectivament, sent el Glu115 i també el Glu238 el pont entre els dos ions metàl·lics. Un segon pont entre els dos Fe^{3+} està format per un grup O^{2-} , l'anomenat pont μ -oxo. A més a més dels lligams carboxilats, dues histidines (His118 i His241) i una molècula d'aigua interaccionen amb cada Fe^{3+} . Així, els dos àtoms de Fe^{3+} són a prop de la coordinació octaèdrica (figura 13) i estan fortament lligats a la proteïna.

Experiments amb EPR han demostrat que els camps magnètics del radical i el centre difèrric interaccionen, fet que es creu que té un efecte estabilitzador sobre el radical.

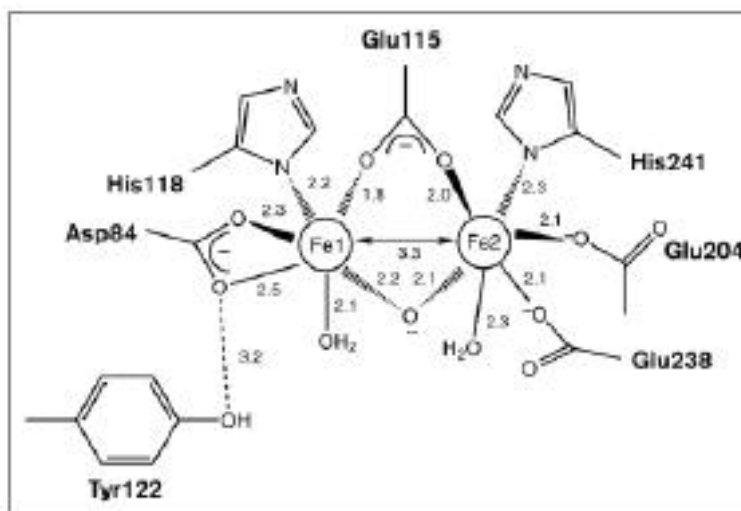


Figura 13. Representació esquemàtica del centre difèrric de la proteïna R2.

1.7.2. Classe Ib

Els productes dels gens *nrdE* i *nrdF* de *Salmonella typhimurium* codifiquen per als productes R1E i R2F, respectivament, que són els més estudiats dins la classe Ib. La diferència més important respecte de les proteïnes prototip de la classe Ia és la manca del lloc al·lostèric que regula l'activitat general de l'enzim (L.A.R.A) de la classe Ia; per tant, són enzims no inhibits pel dATP.

A part d'aquesta diferència estructural respecte a la classe Ia d'*E. coli* només presenten una sèrie de petites diferències. D'aquesta manera, trobem que els components proteics d'aquesta classe poden formar tetràmers sense la necessitat d'afegir-hi cap efector al·lostèric. El radical tirosil presenta un nivell de senyal EPR diferent del que trobem en la RNR de classe Ia (Allard, 1996; Himo, 1997). A escala dels reductants externs la classe Ib, en principi, utilitza la proteïna NrdH-redoxina codificada en el mateix operó pel gen *nrdH* en lloc de les Trx i Grx que utilitza la classe Ia.

Aquesta classe és funcional en *E. coli* i *S. typhimurium*, però no sembla ser essencial sota les condicions normals de creixement en el laboratori. En alguns bacteris aquesta és la classe activa com en *Lactococcus lactis* (Jordan, 1996a), *Mycobacterium tuberculosis* (Yang, 1994), *Corynebacterium ammoniagenes* (Willing, 1988) i *Mycoplasma pneumoniae* (Fraser, 1995).

1.7.2.1 Estructura de la subunitat R1E

Les dades cristal·logràfiques de la proteïna R1E no són del tot definitives, però resultats preliminars permeten veure la gran semblança que hi ha amb l'estructura de la proteïna R1A d'*E. coli*. (Eriksson, 1998a). En l'estructura resolta no es poden definir els *loops* de l'extrem C-terminal. Aquesta és una part no visible en la R1A i correspon amb la part flexible de la proteïna, on interacciona amb les redoxines.

La proteïna conté un gran barril format per 10 làmines β i les 8 α -hèlixs (/) de 480 residus. A la part inferior del barril podem veure una estructura amb domini + que correspon al lloc al·lostèric que controla la regulació general de l'enzim, que en aquest cas és força petit comparat amb el de la subunitat R1A. Això explica per què la inhibició per dATP no es dona en aquesta classe. És en aquesta part on trobem les diferències més grans entre les subunitats grans de les RNR de classe Ia i Ib.

1.7.2.2 Estructura de la subunitat R2F

La proteïna R2F és una proteïna completament helicoïdal (hèlix A- H) sense cap estructura amb fulla β . La superposició és molt més bona amb la proteïna R2 de ratolí que amb la R2B d'*E. coli* (Eriksson, 1998b) mentre que amb el percentatge de similituds en l'estructura primària passa el contrari (figura 14).

Els residus coordinats al centre difèrric són gairebé idèntics als que presenta la proteïna R2B d'*E. coli*. Cada ferro està coordinat per una histidina (His195 i His101), i els dos ferros units per un Glu98. Els altres dos residus, un Glu i una Asp, canvien la seva coordinació i interactuen amb els àtoms de ferro (figura 13).

Figura 14. Superposició de les estructures tridimensionals de les proteïnes R2F (en negre) amb **a)** R2B d'*E. coli* (en blanc) i **b)** R2B de ratolí (en blanc). Els àtoms de ferro del centre difèrric es mostren com esferes de color negre.



La diferència que trobem respecte de la R2B és la molècula d'aigua que interacciona amb els dos àtoms de ferro. Així, tenim que el lligam que forma la molècula d'aigua es posiciona a 2.5-2.6 Å de cada ferro, la qual cosa suggereix que s'uneix als dos. A causa que hi ha dos lligams, l'altre Asp67, que sí que interactua amb els ferros en la R2B, en la R2F només interacciona amb un àtom de ferro (Fe1). En la forma reduïda els dos àtoms de ferro estan units per dos glutamats. Aquests, junt amb una histidina i un aspartat, donen una estructura tetraèdrica quan estan coordinats amb el Fe1. El Fe2 es troba coordinat bivalentment amb el Glu158. La coordinació octaèdrica es produeix quan l'estructura tetraèdrica s'uneix a una molècula extra d'aigua. Aquesta aigua es troba propera al Fe1 (2.9 Å) i fa que aquest centre difèrric reduït s'assembli més a la forma substituïda per manganès (en la R1B) que a la mateixa forma reduïda de la R2B d'*E. coli*.

El residu que se suposa que portarà el radical tirosil és la Tyr105. Aquest se situa a uns 7 Å del ferro més proper, comparat amb els 5 Å en l'estructura R2B.

Una de les diferències més destacables respecte de la R2B es troba en l'hèlix E. Aquesta forma un *turn* del tipus β que evita que es formin els ponts d'hidrogen que estableixen l'hèlix i això provoca que aquesta es desfaci completament. La forma reduïda presenta una conformació estable en l'hèlix E i això permet que el centre difèrric sigui molt més accessible.

Pel que sembla, l'extrem C-terminal junt amb la Tyr163 protegeixen i cobreixen el centre metàl·lic i el radical tirosil. La proteïna R2F sembla que té una porta oberta a les molècules d'oxigen, la qual cosa permet la formació del radical tirosil amb més facilitat. En la forma reduïda aquesta porta es tancaria. Aquesta és la primera

evidència en la qual es relaciona la conformació de l'hèlix E amb l'estat redox de la proteïna (Eriksson, 1998b).

Els residus involucrats en la transferència del radical es troben tots i se superposen perfectament amb els residus descrits per la R2B d'*E. coli*. La transferència va des del radical tirosil (Tyr105) a l'Asp67, al Fe1 i a l'His101, posteriorment va cap a l'Asp191 i el Trp31, sent la resta de la transferència exactament igual a la descrita anteriorment per la R2B.

1.7.3. Classe Ia eucariòtica

Les Ribonucleotidil-Reductases presents en tots els d'organismes eucariòtics són les de classe Ia. Les RNR més estudiades en eucariòtes han estat les de ratolí (*Mus mus*), les de llevat (*Saccharomyces cerevisiae*) i les de *Trypanosoma brucei* (Hofer, 1998).

Els gens que codifiquen per les RNR són les dianes transcripcionals més estudiades com a punts de control en la replicació i reparació del DNA (Huang, 1998).

1.7.3.1 Estructura de la subunitat R2B

Fins al moment tan sols s'ha cristal·litzat la subunitat petita del sistema eucariòtic de ratolí (Kauppi, 1996).

L'estructura s'assembla molt a les estructures de les proteïnes R2B i R2F (figura 14). Tant els lligams com la manera de coordinar el centre difèrric són molt semblants. La diferència principal amb la R2B d'*E. coli* es troba, de la mateixa manera que en l'estructura de la proteïna R2F, en l'accessibilitat que presenta el radical proteic al medi. Això fa que aquesta proteïna sigui més sensible a compostos que destrueixen el radical proteic com són ara la hidroxiurea i els quelants del ferro.

1.8. Classe II

El fet més característic d'aquesta classe és la seva dependència de la S-adenosilcobalamina (AdoCob), que actua com a generador del radical substituint la funció de la proteïna R2 de la classe I. Totes les RNR d'aquesta classe estan codificades pel gen *nrdJ*, i formen una única cadena polipeptídica (NrdJ) relacionada

estructuralment amb les proteïnes R1 (classe I) i NrdD (classe III). L'enzim es pot presentar en forma d'una sola subunitat (), com en *Lactobacillus leichmannii*, o bé en forma dimèrica (2) com en *Thermoplasma acidophila* (Eliasson, 1999). Aquesta classe es troba distribuïda entre els bacteris tant aeròbics com anaeròbics sense que la seva activitat depengui de la presència d'oxigen (Jordan, 1998). L'esquema general de l'enzim, o 2 es mostra en la figura 15.

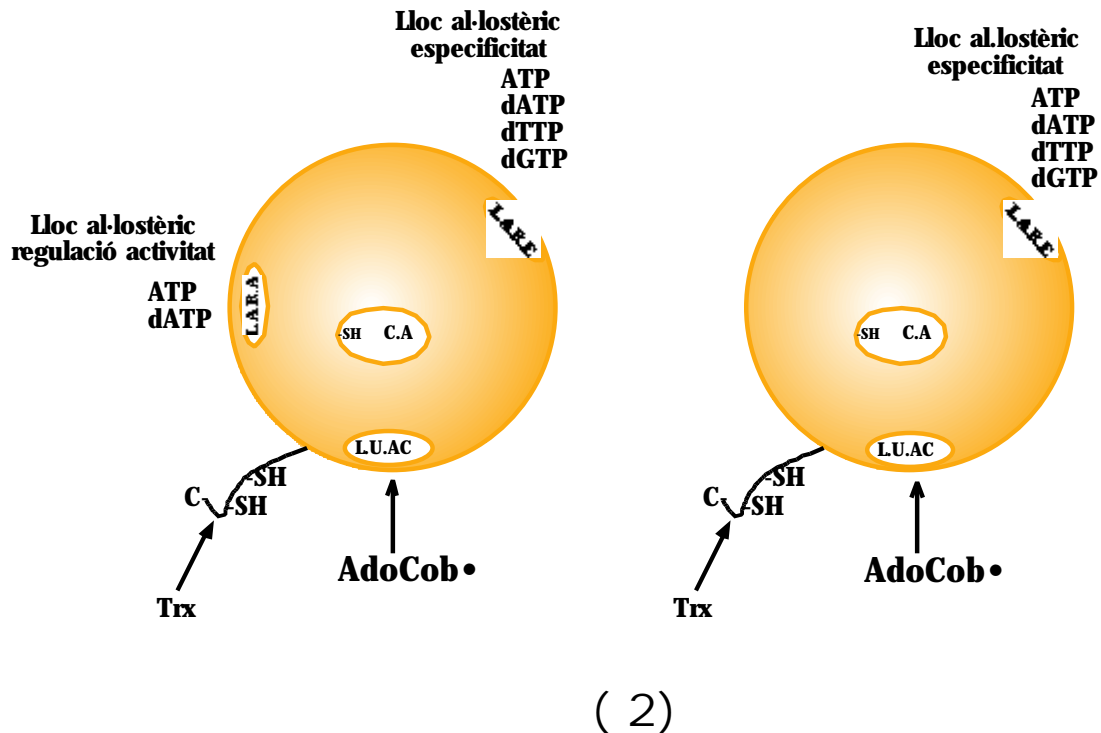


Figura 15. Esquema general per a les RNR de classe II monomèriques. Els dos esquemes representen els dos tipus que podem trobar d'aquest enzim, l'un amb el L.A.R.A i l'altre sense.

L'enzim de *Lactobacillus leichmannii* ha estat durant molt de temps l'únic enzim caracteritzat d'aquesta classe, i n'ha estat el seu prototip.

La RNR de *L. leichmannii* és una proteïna monomèrica de 738 aa (81.9 kDa) que també conté tres cisteïnes involucrades en la catàlisi de l'enzim (Cys119, Cys408 i Cys419) i que es corresponen a les (Cys225, Cys439 i Cys462) de la proteïna R1A d'*E. coli* (Booker, 1994) (vegeu l'apartat 1.7.1.1). Es creu que aquestes cisteïnes es disposarien de la mateixa manera a la que es poden trobar en el centre actiu de la proteïna R1A d'*E. coli*; així, podem dir que presenten un sistema catalític molt

semblant. La part C-terminal de la proteïna conté dues cisteïnes més (Cys731 i Cys736), i presenten un motiu molt semblant al d'*E. coli* (Cys754 i Cys 759), el qual interacciona amb les tioredoxines. L'enzim de *L. leichmannii* depèn constantment de la tioredoxina per al bescanvi catalític de l'enzim. Els estudis fets en aquest enzim demostren que l'AdoCob interacciona directament amb el centre actiu, captant l'àtom d'hidrogen de la Cys408, i es genera cobalamina (II), localitzada a 6Å de la cisteïna, i 5'-desoxiadenosina (Licht, 1996).

Quan en els darrers anys s'han obtingut més seqüències proteiques dels enzims de classe II, s'ha posat de manifest que la seqüència de *L. leichmannii* és totalment atípica i diferent de totes les altres seqüències de classe II descrites recentment (Tauer, 1997; Riera, 1997; Jordan, 1997b).

La primera seqüència d'una classe II diferent de la de *L. leichmannii* que es va descriure fou la de *Thermoplasma acidophila*, i que presenta una identitat del 20%, amb 857 aa i 97 kDa. Analitzant la seqüència de *T. acidophila* es va veure que en la seva part central presentava una similitud estructural molt alta amb la classe Ia, tant procariota com eucariota. Totes les cisteïnes importants encarregades de generar el radical tiil hi estaven presents. La part N-terminal presentava un màxim nombre d'identitats amb la proteïna NrdD anaeròbica d'*E. coli*. En l'extrem C-terminal es va poder determinar el possible domini d'unió a l'AdoCob, amb un motiu estructural (DX-/-HXXG-/-SXL-/-GG) (Tauer, 1997).

Paral·lelament apareix la seqüència de classe II de *Pyrococcus furiosus*. La seqüència de DNA presentava un ORF de 4.5 kpb, amb una hipotètica proteïna de 1.740 aa i amb un pes molecular de 200 kDa. La proteïna prèviament purificada presentava tan sols 90 kDa. Aquesta gran discrepància es dona per la presència de dues inteïnes de 454 i 382 residus cadascuna en la proteïna. Una vegada se sintetitza la proteïna, les dues inteïnes s'escindeixen i donen el polipèptid processat de 90 kDa (Riera, 1997). Aquesta seqüència de *P. furiosus* amb un 28% d'identitat amb la R1A de ratolí, un 22% amb la R1A d'*E. coli*, un 23% amb el NrdD d'*E. coli* i un 40% amb la proteïna de *T. acidophilum*. Sorprenentment, tan sols presentava un 22% d'identitat amb la proteïna NrdJ de *L. leichmannii*. La seqüència de *P. furiosus* també presenta totes les cisteïnes conservades en el centre actiu, importants per la reducció dels NTP. Aquestes identitats en la seqüència corroboren la gran similitud estructural de les tres classes, la qual cosa emfatitza que les tres classes tenen una

relació evolutiva comuna. El nostre grup de recerca va aprofundir en l'estudi de les RNR de classe II, caracteritzant i seqüenciant les RNR de *Deinococcus radiodurans* i *Thermotoga maritima*, i vam trobar una similitud estructural amb la classe Ia (Jordan, 1997b). La regulació d'aquesta classe d'enzims ha estat estudiada de forma molt elegant en el laboratori del prof. Peter Reichard en les RNR de *L. leichmannii*, *T. maritima* i *T. acidophilum* (Eliasson, 1999). Aquests enzims, corresponents a diferents espècies, presenten certes peculiaritats malgrat que pertanyen a la mateixa classe. Tots ells regulen l'especificitat pel substrat de la mateixa manera que els enzims de la classe Ia (vegeu l'apartat 1.5). Una de les diferències és que a *T. acidophilum* utilitza el dCTP i el dTTP com a efectors positius per a la reducció del GTP. Prenent com a model la RNR de *L. leichmannii*, es pensava que aquesta classe no contenia el lloc al·lostèric que governa l'activitat general de l'enzim de la mateixa manera que passa en la classe Ib. Gràcies a aquest treball (Eliasson, 1999) es va veure que podem dividir les RNR d'aquesta classe en dos tipus en funció de la seva regulació al·lostèrica general. Així, tenim que *L. leichmannii* i *T. maritima* contenen únicament un lloc al·lostèric que uneix els mateixos efectors que el lloc al·lostèric de l'especificitat de les classes Ia i Ib. En canvi, *T. acidophilum* conté dos llocs al·lostèrics: un capaç d'unir tots els nucleòtids i un altre que uneix ATP i dATP. Malgrat que, per homologia amb la classe Ia, s'ha vist que aquest segon lloc al·lostèric de *T. acidophilum* conté tots els residus específics per governar l'activitat general de l'enzim, sorprenentment no actua com a tal, ja que el dATP no inhibeix l'enzim (Eriksson, 1997).

1.9. Classe III

Aquesta classe només funciona en condicions anaeròbiques estrictes, a causa que l'oxigen destrueix la cadena polipeptídica. La classe III més estudiada i la primera que es va descobrir en l'àmbit bioquímic ha estat la d'*E. coli*.

El descobriment d'aquesta classe de RNR per part del grup del prof. Peter Reichard, va suposar el trencament amb la idea que cada microorganisme contenia únicament una RNR. En l'estudi de tots els components d'aquest sistema s'ha tingut en compte un altre sistema enzimàtic amb estructura i mecanisme d'activació molt semblants

als de les RNR de classe III. Es tracta de l'enzim piruvat format liasa (PFL), que catalitza el trencament no oxidatiu del piruvat a acetil-CoA i format, reacció clau en el metabolisme anaeròbic de la glucosa (Knappe, 1990; Wagner, 1992).

A finals dels vuitanta i principis dels anys noranta, es van esbrinar certs requeriments per reduir anaeròbiamment el CTP. Es va veure que el NADPH, el Mg^{2+} i l'ATP estimulaven fortament la reacció (Fontecave, 1989a i b). Posteriorment es van purificar tots els components involucrats en la reducció dels ribonucleòtids en extractes anaeròbics d'*E. coli*.

Els gens que codificaven per a aquesta classe foren seqüenciats en *E. coli* i es van denominar *nrdD* i *nrdG* (Sun, 1993 i 1995). El gen *nrdD* codifica per a la proteïna NrdD de 712 aa i 80 kDa. El gen *nrdG* codifica per a la proteïna activasa del sistema (proteïna NrdG) de 154 aa i 17.5 kDa.

La forma activa de l'enzim de classe III és una proteïna homodimèrica (α_2), amb un pes molecular de 160 kDa. La proteïna NrdG també és una proteïna homodimèrica (α_2) de 35 kDa. Encara no està del tot clar si el dímer que forma la proteïna NrdG forma part de l'holoenzim actiu o només actua com una proteïna accessòria en la generació del radical. L'estructura general que presenta l'enzim actiu d'aquesta classe es mostra en la figura 16.

Més tard, i prenent com a referència l'enzim PFL, es va veure que el radical proteic per a aquesta classe era una glicina, que és necessària per a l'activitat enzimàtica (Mulliez, 1993; Sun, 1996). La generació del radical és molt peculiar ja que requereix de la S-adenosilmetionina (AdoMet) (Eliasson, 1990), un centre de ferro-sofre (Tamarit, 1999) present en la proteïna NrdG, i un sistema reductor constituït per la flavodoxina reductasa i la flavodoxina (Bianchi, 1993a i b).

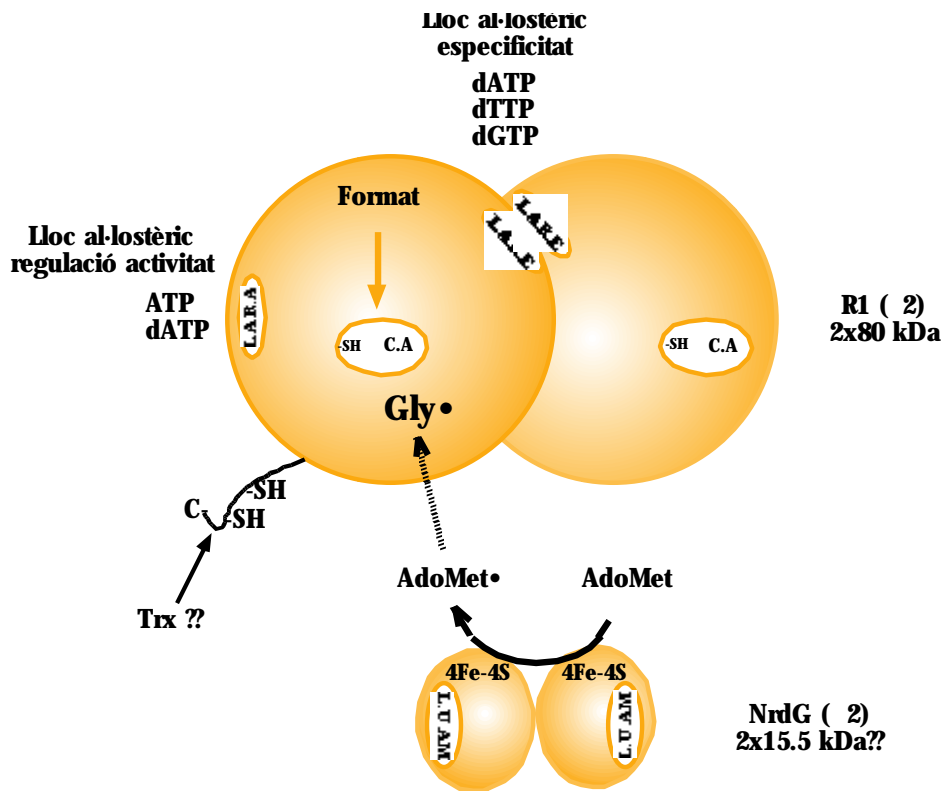


Figura 16. Esquema general de les RNR de classe III.

L'activació general del sistema es mostra en la figura 17. L'últim donador d'electrons és el NADPH.

L'altra RNR de classe III molt estudiada ha estat la del fag T4. La primera evidència que el fag T4 tenia una RNR anaeròbica es va donar quan es van obtenir les seqüències dels gens *nrdD* i *nrdG* d'*E. coli*. Aquests presentaven una similitud al voltant del 70% amb dos gens del fag ja seqüenciats: *sunY* i el gen 55.9, i posteriorment anomenats *nrdD* i *nrdG* seguint la nomenclatura establerta per *E. coli* (Young, 1994a i b).

Un altra RNR de classe III estudiada és la de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Hogenkamp, 1987; Sze, 1992). L'activitat anaeròbica estudiada és sensible a l'oxigen i requereix d'AdoMet. La proteïna no ha estat caracteritzada perquè no s'ha pogut purificar però, a partir de la publicació recent del genoma d'aquest bacteri, s'ha pogut determinar que conté una seqüència similar als enzims de la classe III d'altres microorganismes (Smith, 1997).

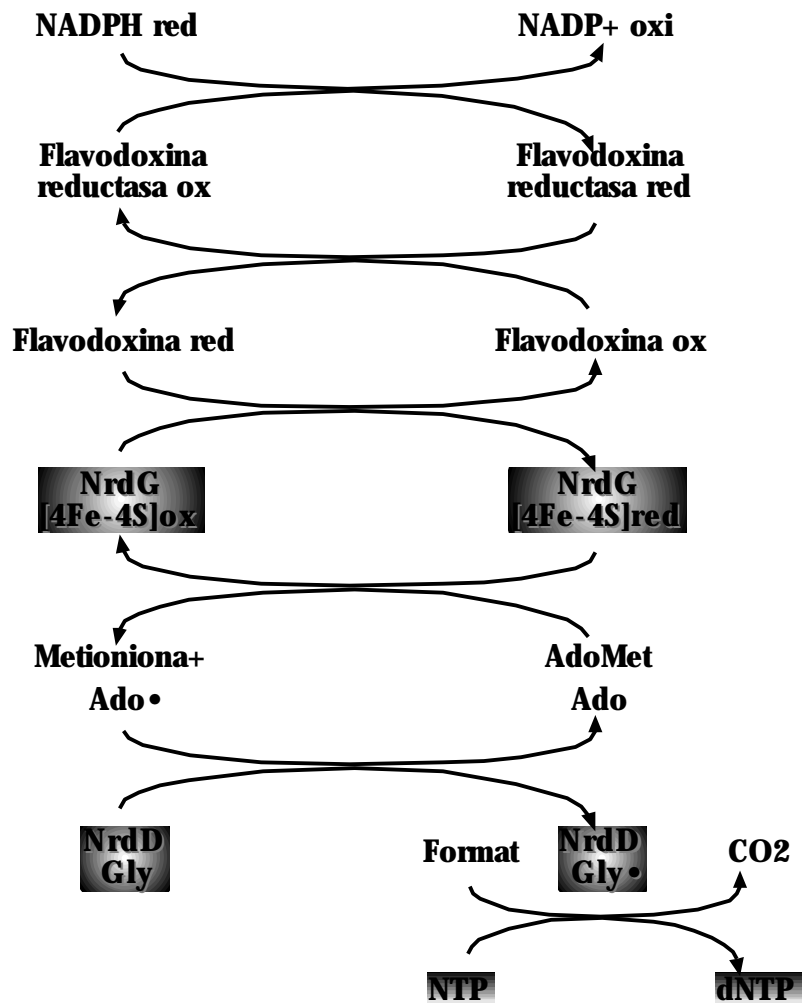


Figura 17. Esquema general d'activació per a la RNR anaeròbica de classe III.

1.9.1. Estructura de la Ribonucleotidil-Reductasa del fag T4

La primera estructura tridimensional que s'ha obtingut d'aquesta classe ha estat la del fag T4 (Logan, 1999). Aquesta RNR té una seqüència atípica dins de les classes anaeròbiques ja que presenta un escurçament considerable en la seva part N-terminal i el lloc al·lostèric de l'activitat general de l'enzim hi es absent.

Els cristalls es van obtenir utilitzant un mutant per a la Gly580, evitant així els efectes de trencament de la molècula per l'acció de l'oxigen molecular (King, 1995).

En general, l'estructura ens revelava que malgrat les seqüències entre les classes I i III no eren homòlogues, el plegament general de l'estructura és el mateix que el de la classe Ia d'*E. coli*. El característic plegament de 10 cadenes disposades en un barril / envoltant el centre actiu, és present també en l'estructura de la classe III. Dos

dominis amb 5 fulles- estan unides de forma antiparal·lela amb l'anomenat *finger-loop*. Aquestes fulles- estarien flanquejades per l' -hèlix, (figura 18).

Aquesta és la primera evidència experimental que corrobora el fet de l'existència d'una estructura ancestral comú entre ambdues estructures.

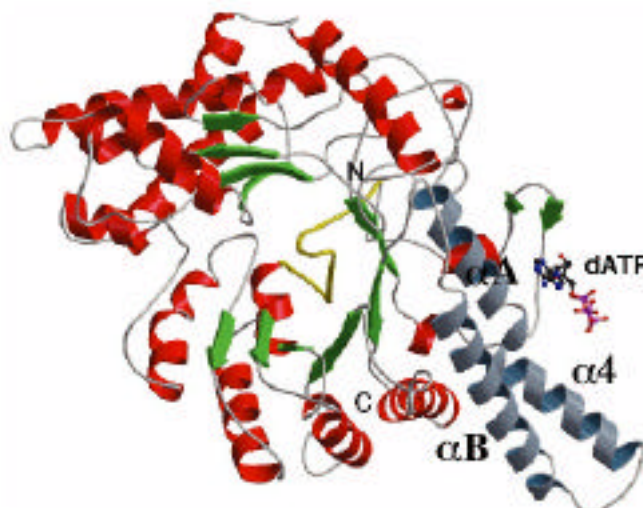


Figura 18. Representació tridimensional de la proteïna NrdD d'*E. coli* (segons Logan, 1999)

Malgrat aquesta semblança estructural amb la R1A hi existeixen certes diferències. Així doncs, tenim que dues de les -hèlixs (A i B) són més llargues que en l'estructura de la R1A, a més a més, una -hèlix (4) addicional s'ha inserit en l'estructura. En ambdós casos, en aquesta regió es dona la interacció entre els dos monòmers. La formació del dímer és la màxima diferència entre les estructures quaternàries d'R1A i la proteïna NrdD (vegeu l'apartat 1.7.1.1).

En el centre actiu de la proteïna NrdD, la Cys290 es localitza a la part superior d'un *loop* en la mateixa posició en què trobaríem la Cys439 de la subunitat R1A. La Cys79 de la proteïna NrdD també es localitza en la mateixa posició que la Cys225 en la R1A. En lloc de la tercera cisteïna de la R1A, Cys462, trobem un Asn311 en la proteïna NrdD. Per tant, el mecanisme de reacció ha de considerar-se lleugerament diferent ja que sols hi intervenen dues cisteïnes en lloc de tres (Eklund, 1999). Treballs posteriors suggereixen que aquest residu (Asn311) està involucrat en la fixació del format, important a l'hora de realitzar la reducció del ribonucleòtid (Andersson, 2000).

Pel que fa al radical glicil, característic d'aquesta classe, es troba molt proper al centre actiu de l'enzim. La Gly580 es troba a la punta d'un *loop* que penetra en el centre actiu. Aquesta curta distància fa del tot innecessari un sistema de transferència del radical com passa amb altres classes de RNR.

1.9.2. Similitud entre la RNR amb la piruvat format liasa

L'estructura tridimensional de la PFL ha estat resolta recentment (Becker, 1999). El més sorprenent és l'estructura general que adopta aquest enzim. Presenta la mateixa estructura en barril / al voltant el centre actiu i hi ha dues cisteïnes (Cys418 i Cys419) en el centre actiu, importants per a la catàlisi. Igualment, el radical es troba en una Gly734 localitzada a l'extrem C-terminal. La Gly734 i la Cys419 estan localitzades a la part superior d'un *loop* petit, d'igual manera que el que trobem a la proteïna NrdD i a la proteïna R1A.

A causa de la gran diferència que hi ha en l'estructura primària, és sorprenent que aquest tipus de proteïnes conservin amb la seva estructura terciària tanta fidelitat.

1.10. Organització i regulació genètica

La reducció dels ribonucleòtids té un paper molt important en el metabolisme cel·lular, ja que controla els nivells dels quatre dNTP, que es requereixen de manera equilibrada per a la síntesi i reparació del DNA. Un desequilibri en la concentració dels dNTP produïts pot facilitar la introducció de mutacions en el DNA que podrien ser fatals i podrien afectar la viabilitat de l'organisme.

En qualsevol tipus cel·lular es dona un increment màxim en la producció dels dNTP quan la cèl·lula s'ha de dividir o bé s'ha de reparar el DNA.

D'aquesta manera, per poder subministrar equilibradament els dNTP necessaris en cada moment els gens que codifiquen per a les diferents RNR han d'estar estrictament regulats. Així ens podem trobar que un microorganisme amb dues classes aeròbiques (classe Ia i Ib, o la combinació d'aquestes amb la classe II) o bé que té la classe II junt amb la classe III en situacions d'anaerobiosi, o bé les tres classes juntes. Per tant, esdevé essencial assolir una bona coordinació en la regulació

de l'expressió dels gens per a les diferents classes de RNR, la qual cosa garanteix la concentració adient d'enzim que proporciona nivells equilibrats dels dNTP.

1.10.1. Els gens *nrdAB* procariòtics (classe Ia)

Els gens més estudiats pel que fa a l'organització i regulació genètica han estat els gens *nrdAB* d'*E. coli*. Es localitzen a la unitat 48.5 del cromosoma bacterià i donen lloc a les proteïnes R1A i R2B a partir d'una sola unitat transcripcional de 3.2 kpb. Entre el gen *nrdB* (1.131 pb) i el gen *nrdA* (2.286 pb) existeix una seqüència separadora no codificant de 226 pb, amb el promotor principal que regula l'operó localitzat a 110 pb per davant del codó ATG d'inici de traducció, amb seqüències -35 i -10 molt semblants a les seqüències que es troben en procariotes (Tuggle, 1986).

En la zona intergènica trobem 4 seqüències del tipus REP (*repetitive extragenic palindromic*) que, hipotèticament, podrien intervenir en la regulació de l'estabilitat de l'mRNA, protegint-lo de la degradació o modulant la seva traducció (Higgins, 1988).

La seva transcripció està lligada al cicle cel·lular i als danys que es produeixen en el DNA. La inhibició de la replicació cel·lular ja sigui per manca de timina, per inhibició de la DNA girasa per l'efecte de l'àcid nalidíxic, per l'efecte de l'hidroxiurea, o bé en mutants condicionals del DNA, desencadena un increment coordinat de la transcripció dels gens *nrdAB* (Fuchs, 1977; Sun, 1992). Veient el tipus d'inductors que estimulen la transcripció dels gens *nrdAB* podríem pensar que hi ha una relació entre aquests gens i el sistema SOS, però estudis realitzats en la regió promotora no han pogut localitzar cap caixa SOS.

Estudiant la regió promotora s'ha trobat un gran nombre de motius implicats en la regulació de la transcripció. Així, tenim que les proteïnes DnaA i FIS s'uneixen específicament activant la transcripció, de manera independentment al cicle cel·lular (figura 19). Una regió rica amb A/T, localitzada per sota de la regió FIS seria la responsable d'incrementar la transcripció després de la inhibició de la síntesi del DNA, se'n desconeix de quin regulador es tracta (Augustin, 1994; Sun, 1994a i b).

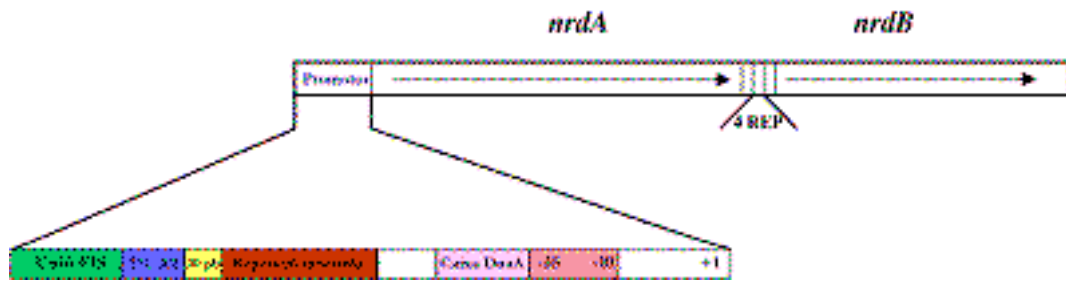


Figura 19. Representació esquemàtica de l'operó *nrdAB* d'*E. coli*. Es mostra de forma ampliada la regió promotora.

Recentment s'han identificat dues regions més en la regió promotora que regularien la transcripció d'aquest operó. Es localitza entre la regió rica en A/T i la d'unió a la DnaA, i correspon a una repetició invertida de 45 pb, sobre la qual actuaria un factor transcripcional que regularia l'operó en funció del cicle cel·lular. L'altra regió, situada just per sota de la regió rica en A/T i per davant de la regió invertida descrita anteriorment, de 10 pb i invertida, actuaria incrementant l'expressió dels gens *nrdAB*. També es desconeix de quin regulador es tracta, encara que sí que sabem que actuaria en forma cis (figura 19) (Jacobson, 1998a i b).

Mutants en el sistema de les tioredoxines i glutaredoxines també presenten augmentada l'expressió dels gens *nrdAB* unes 9-10 vegades, la qual cosa implica algun altre tipus de control sobre aquest gens que fins al moment es desconeixia, tot i que, estaria relacionat amb el sistema antioxidantiu general de la cèl·lula (Gallardo-Madueño, 1998).

1.10.2. Els gens *nrdEF* (classe Ib)

En l'àmbit transcripcional els gens més estudiats d'aquesta classe han estat els d'*E. coli*. Aquest bacteri conté dues classes I aeròbiques, fet que fa més atractiu el seu estudi ja que, en principi, totes dues RNR sorprendentment podrien suportar el creixement aeròbic d'aquest microorganisme.

Els gens (*nrdEF*) formen part d'una única unitat transcripcional que codifica per a quatre ORF diferents i es troba localitzada en la unitat 57 del cromosoma tant d'*E. coli* com de *S. typhimurium* (figura 20) (Jordan, 1996b). Davant dels gens *nrdEF* trobem el gen *nrdH*, que codifica per a una proteïna de 9 kDa que actua com a donador d'electrons específic del sistema. A continuació trobem el gen *nrdI*, que

codifica per a una proteïna de 15 kDa aparentment de funció desconeguda, encara que imprescindible en el sistema dels gens *nrdEF* (Sala, comunicació personal).

Treballs previs en el nostre laboratori han demostrat que el promotor s'indueix tan sols per l'hidroxiurea i no pas per molècules que inhibeixen la replicació cel·lular o aquells que lesionen el DNA. Mitjançant RT-PCR s'ha vist que l'operó es transcriu a nivells molt baixos en comparació amb els gens *nrdAB*, i no és capaç de complementar un mutant condicional per a la RNR de classe Ia. Es poden arribar a complementar un mutant *nrdAB* en *E. coli* quan s'afegeix una segona còpia dels gens *nrdEF* mitjançant un merodiploide o un plasmidi (Jordan, 1996b). Un mutant per a la RNR de classe Ib és totalment viable en condicions de creixement aeròbiques.

Malgrat que els estudis inicials indicaven una transcripció molt baixa d'aquest operó, treballs recents demostren una possible funció dels gens en condicions concretes de creixement. Així doncs, gràcies a un treball de genòmica funcional en *E. coli*, s'ha vist que l'expressió dels gens *nrdEF* s'incrementa quan el bacteri està creixent en medi mínim (M63 més un 0.2% de glucosa) respecte al creixement en medi ric LB (Luria Bertani) (Tao, 1999).

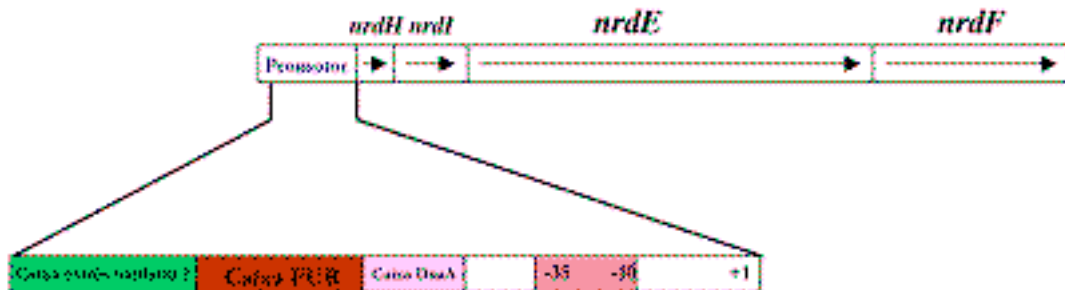


Figura 20. Representació esquemàtica de l'operó *nrdEF* d'*E. coli*. Es mostra de forma ampliada la regió promotora i amb interrogants les possibles caixes que s'hi poden trobar.

Un altre factor que incrementa la seva expressió és la manca de ferro en el medi. S'ha determinat que els gens *nrdEF* estan controlats pel regulador FUR (Ferric Uptake Regulator). En *E. coli* existeix una caixa FUR compartida entre l'operó

nrdHIEF i el gen just anterior, *ygaC* (Vassinova, 2000). Normalment FUR es trobaria unit al promotor de l'operó *nrdHIEF* i n'inhibiria l'expressió. En condicions de manca de ferro, el regulador es desenganxa del promotor i es permet l'expressió d'aquests gens. La proteïna FUR és un regulador transcripcional que actua principalment com a repressor d'un gran nombre de gens. Sobretot intervé en el control de l'expressió de gens implicats en la captació de ferro i gens de virulència (Escolar, 1999). Aquests resultats corroborarien els obtinguts per Hanke, que va determinar que un mutant per a la subunitat R2B d'*E. coli* era viable creixent en condicions aeròbiques en un medi mínim M3 amb un quelant de ferro (Hanke, 1988).

Finalment al laboratori de la Dra. Pueyo s'ha esbrinat, mitjançant un nou sistema de detecció i quantificació dels mRNA (multiplex RT-PCR), la relació entre aquests gens i el sistema oxidatiu cel·lular (Monje-Casas, 2001). S'ha pogut veure que l'expressió en *E. coli* depèn del cicle de creixement del cultiu, i es troba un màxim d'expressió al principi de la fase exponencial del cultiu que s'abaixa a nivells molts baixos (25 vegades menys) ja al final d'aquesta fase. Els sistema s'expressa fins a 75 vegades més, sota condicions de creixement en medi mínim, la qual cosa corrobora els resultats descrits anteriorment per Tao *et al.* (Tao, 1999).

S'ha descrit també una possible relació dels gens *nrdEF* amb la manca dels gens que codifiquen el sistema de les redoxines, ja que mutants defectius en tioredoxina 1 i glutaredoxina 1 expressen unes 100 vegades més els gens *nrdHIEF* (Monje-Casas, 2001).

El fet més interessant i atractiu descrit en el treball de Monje-Casas ha estat l'increment de la transcripció dels gens *nrdHIEF* en resposta a l'estrès oxidatiu, particularment en mutants que no tenen hidroperoxidasa I i alquilhidroperoxidasa reductasa (70 vegades més), o en tractar les cèl·lules amb agents oxidants com el peròxid d'hidrogen, 4-nitroquinolina i paraquat (24 vegades més). El mecanisme concret que fa augmentar l'expressió en resposta a aquests tipus d'estrès encara és una incògnita però s'exclou la participació de reguladors generals com ara: RpoS, Fis, cAMP, OxyR, SoxR/S i RecA (Monje-Casas, 2001).

Aquests resultats ens mostren que la regulació sembla ser totalment diferent però complementària a la regulació dels gens *nrdAB*, la qual cosa indica que ambdós sistemes juguen un paper clau en el funcionament correcte del metabolisme cel·lular.

Queda pendent esbrinar quin paper juga cada RNR aeròbica en un mateix microorganisme i, d'altra banda, determinar el tipus de regulació a la qual la classe Ib es troba sotmesa en aquells bacteris on és la classe principal o única en condicions de creixement aeròbic.

1.10.3. Els gens *nrdAB* eucariòtics (Classe Ia)

1.10.3.1 Ratolí

Els gens que codifiquen per a la subunitat R1A i R2B es localitzen en cromosomes diferents: el gen *nrdA* en el cromosoma 7 i el gen *nrdB* en el 12 essent la regulació de l'un independent de la altre.

Els nivells transcripcionals estan fortament regulats i depenen de l'estadi del cicle cel·lular en el qual es troba la cèl·lula. Els màxims nivells d'expressió de la proteïna R2B es donen en la fase S (Engström, 1985; Björklund, 1990). Els nivells de R1A es troben pràcticament constants al llarg de tot el cicle. La proteïna R2B presenta una vida mitjana de 20 h; en canvi, els nivells del seu mRNA mostren un patró S-dependent amb una vida mitjana de 3 hores quan la cèl·lula està creixent exponencialment. D'altra banda, la proteïna R1 es manté constant i en excés al llarg de tot el cicle cel·lular. Per tant, són els nivells de la proteïna R2B el factor limitant de l'activitat de l'enzim (Eriksson, 1984; Mann, 1988).

La proteïna R1A es transcriu a partir d'un promotor que no té la caixa TATA, i està controlat per tres proteïnes d'unió al DNA. L'expressió d'una d'elles depèn del cicle cel·lular i les altres dues actuen estabilitzant el transcrit en la regió 3' possiblement regulades per la proteïna quinasa C.

El promotor que controla la proteïna R2 està regulat per quatre proteïnes diferents. Una d'elles és el factor de transcripció NF-Y, important en la

transcripció basal del gen. Les altres tres actuen com a inductors en els processos de proliferació cel·lular (Filatov, 1995).

Un dels factors més importants que actua regulant la quantitat d'R2B és el sistema proteolític cel·lular, ja que elimina totalment la presència d'aquesta proteïna durant la mitosi. En canvi, quan hi ha lesions en el DNA s'estabilitza la proteïna R2B (Chabes, 2000a). Com hem indicat anteriorment, el sistema per regular la reducció dels NTP es basa en el control de l'expressió de la proteïna R2B. Aquests tipus de regulació que depèn de la quantitat de R2B, també s'ha trobat en altres tipus d'organismes eucariòtics, com en el cas de *Trypanosoma brucei* (Breidbach, 2000).

S'ha determinat que en situacions *in vivo*, la RNR està fortament regulada per la inhibició deguda al dATP. Aquest control al·lostèric representaria un altre factor important per mantenir uns nivells correctes de dNTP en la cèl·lula (Reichard, 2000).

El model de regulació de la RNR que trobem en ratolí es pot fer extensiu als mamífers en general, incloent-hi l'home.

1.10.3.2 Llevat

S'han identificat tres gens involucrats en la reducció dels dNTP en llevat: un que codifica la proteïna petita (RNR2) i dos que codifiquen dues subunitats grans (RNR1 i RNR3). Estudiant l'expressió d'aquests gens, es va veure que els nivells de la proteïna RNR2 eren constants al llarg de tot el cicle cel·lular, mentre que la proteïna RNR1 mostrava una expressió dependent del cicle cel·lular, al contrari del que trobem en ratolí. Per tant, en aquest cas, la quantitat d'holoenzim actiu depèn de la concentració de la proteïna RNR1. En condicions normals de creixement la subunitat RNR3 no s'expressa i ho fa després de l'exposició de la cèl·lula a compostos químics i físics que lesionen el DNA com l'UV (Elledge, 1990).

Gràcies a la clonació i l'expressió d'aquests gens en *E. coli*, es van poder fer estudis enzimàtics amb les proteïnes purificades d'aquest sistema. Els primers assajos enzimàtics es van dur a terme barrejant les proteïnes pures RNR2 i la RNR1 però, sorprenentment, aquestes dues proteïnes no eren capaces de formar un enzim actiu que reduís els NTP. L'holoenzim obtingut no era capaç de crear

el radical tirosil en la proteïna RNR2. Posteriorment es va identificar un gen que codificava per a una còpia addicional de la subunitat petita, la RNR4 (Wang, 1997). En barrejar la proteïna RNR4 amb les proteïnes RNR1 i RNR2, es donava un sistema enzimàtic complet i totalment actiu, i es detectava una activitat enzimàtica màxima quan es copurificaven les proteïnes RNR2 i RNR4 en el mateix bacteri que sobreexpressava ambdues proteïnes. Estudis posteriors han indicat que la proteïna RNR4 indueix un plegament òptim en la proteïna RNR2, la qual cosa permet que es pugui crear el radical tirosil (Chabes, 2000b). A més a més d'aquesta peculiar organització heterodimèrica de la subunitat petita, aquest sistema presenta un altre tipus de regulació peculiar. S'ha trobat una proteïna, anomenada Sml1, que s'uneix a la proteïna RNR1 inhibint-la, d'aquesta manera es pot regular l'activitat general de l'enzim (Chabes, 1999). En estudis realitzats per determinar l'expressió transcripcional de totes les subunitats que formen part d'aquest sistema es pot veure que els nivells de RNR2/RNR4 es troben en un valor basal en totes les fases del cicle cel·lular. En canvi, els nivells de RNR1 són baixos en la fase G1 i alts durant la fase S. No es troba expressió de la proteïna RNR3 durant el cicle normal de creixement. Els nivells de Sml1 varien de manera inversa respecte a l'expressió de RNR1. Quan hi ha un dany en el DNA, hi ha un increment de l'expressió de la proteïna RNR3 i també de la proteïna Sml1, que actua inhibint la subunitat RNR1 i afavorint la subunitat RNR3. Un altre mecanisme de regulació a escala més enzimàtica seria la regulació per inhibició pel dATP, de la mateixa manera que es dona en la RNR de ratolí, però sembla ser que aquest no és un factor important en els llevats (Chabes, comunicació personal).

1.10.4. Els gens *nrdDG* (classe III)

Els gens *nrdD* (2.139 pb) i *nrdG* (465 pb) formen un operó en *E. coli* i es troba localitzat en el minut 96 del cromosoma. Els gens *nrdD* i *nrdG* estan separats per 175 pb, on es localitzen dues seqüències REP completes i una altra d'incompleta. Els RBS (*ribosoma binding site*) del gen *nrdG* no és presenta del tot complet i això explica per què trobem la proteïna NrdG expressada 10 vegades menys que la

proteïna NrdD. El fet més característic d'aquest operó és la seva regulació dependent de la concentració d'oxigen. Trobem que a 236 pb per davant el codó d'inici de traducció del gen *nrdD*, i a 55 pb de l'inici de la transcripció hi ha una caixa d'unió per la proteïna FNR (*Fumarat Nitrat Reductasa*). És un factor de transcripció que actua activant una sèrie de gens en resposta a condicions de baixa tensió d'oxigen (Sun, 1993). La proteïna FNR s'uneix a un motiu de consens de DNA (TTGAT-N₄-ATCCA) que es troba entre 25 i 60 pb, sempre per davant de l'inici de transcripció (Kiley, 1999).

Experimentalment no s'ha determinat encara el possible inici de transcripció i hi ha tres possibles candidats: a 178, 303 i 350 pb per davant del gen *nrdD*. Els gens *nrdDG* s'indueixen sota condicions de microaerofília i anaerobiosi estricta, condicions en les quals es dona la inactivació de la transcripció dels gens *nrdAB*. Es creu que ha d'haver-hi altres tipus de reguladors que controlin la transcripció d'aquest gens. Un dels possibles candidats podria ser el sistema ArcAB, que té un paper important en l'adaptació de la cèl·lula a les condicions d'aerobiosi o anaerobiosi (Sawers, 1999). L'activació o inactivació de l'expressió de les diferents RNR que presenta *E. coli* en funció de l'exposició a diferents nivells d'oxigen, hauria de ser un procés estrictament regulat ja que ha de permetre el manteniment d'un subministrament equilibrat de dNTP en tot moment.

1.11. Distribució i evolució de les Ribonucleotidil-Reductases

El manteniment de la vida sobre la Terra depèn de la capacitat que té per reproduir-se en si mateixa. Per a això cal un emmagatzematge estable i acurat de tota la informació genètica d'un organisme.

Podríem dir que en biologia evolutiva hi ha un argument present en tot moment i versa sobre què va esdevenir primer: l'ou o la gallina? En termes més moderns de biologia molecular, aquesta darrera frase es transforma en què va esdevenir primer, l'RNA, el DNA o les proteïnes?. Ara com ara, hi ha forts arguments a favor de considerar el RNA com a molècula primordial amb activitat autoreplicativa. Tant el DNA com l'RNA contenen la informació per duplicar-se a si mateixes a partir de l'aparellament de bases complementàries, i ambdues

necessiten una maquinària proteica (DNA i RNA polimerases) per dur a terme la seva duplicació.

Així, podríem dividir l'evolució del material genètic almenys en tres fases diferents; en la primera trobaríem genomes amb molècules semblants als àcids nucleics (polímers semblants a l'RNA), en la segona aquests genomes estarien compostos per RNA i en l'última aquests genomes contindrien DNA de doble cadena igual que el que trobem avui en dia.

L'any 1981 el Dr. Thomas Cech i el Dr. Sidney Altman van descobrir que l'RNA tenia capacitat per catalitzar reaccions químiques, i van aportar nous arguments que van modificar la concepció que es tenia fins aleshores sobre quina era la molècula que emmagatzemava la informació genètica en les primeres etapes de la vida sobre la Terra. Per primera vegada es començava a parlar d'un món de RNA (Gilbert, 1986; Lewin, 1986). Aquesta forma de vida es va originar amb la internalització de molècules de RNA dins vesícules de pseudolipoproteïnes. Aquest fet va donar-se moltes vegades fins que es va originar un mecanisme coordinat on es produïa la replicació d'aquests àcids nucleics.

Hi ha diversos fets que reforcen la idea d'una vida basada en l'RNA com a precursora d'una vida basada en el DNA (Joyce, 1989; Lazcano, 1988): (i) La replicació dels genomes de DNA comença amb *primers* de RNA. L'mRNA, el tRNA i el rRNA són imprescindibles per a la traducció. La síntesi de les proteïnes es pot donar sense DNA però no pas sense RNA (Noller 1992). (ii) Molts coenzims són derivats dels ribonucleòtids i contenen purines, pirimidines, piridines i altres bases nitrogenades com el NAD⁺, NADPH, FAD, coenzim A, coenzim B₁₂, ATP i la S-adenosilmetionina. (iii) Les molècules de RNA tenen capacitat catalítica (Pace, 1985). (iv) El grup 2'-OH de la ribosa pot estar involucrat en les fosforilacions i en les reaccions de condensació d'aminoàcids. (v) La biosíntesi dels desoxinucleòtids sempre ve precedida per una via enzimàtica que redueix els ribonucleòtids, com hem vist en altres apartats d'aquesta introducció. L'enzim que du a terme aquesta funció és la ribonucleotidil reductasa (Reichard, 1993).

La concepció d'un món de RNA, però, tot i estar àmpliament acceptada també té els seus detractors, i els arguments en contra no s'han de despreciar. Així, la molècula de RNA és una molècula extremament complexa i la probabilitat que

aparegués de manera espontània en un món prebiòtic és molt baixa. A més a més, el grup 2'-OH pot catalitzar el trencament de l'enllaç fosfodiester adjacent, fent la molècula de RNA poc útil per emmagatzemar la informació genètica a llarg termini. Aquest darrer problema se soluciona substituint l'RNA per DNA com a molècula per emmagatzemar la informació genètica a llarg termini i amb fidelitat (Eichhorn, 1971). Malgrat tots els ribozims que s'han creat artificialment, no se n'ha pogut aïllar cap amb capacitat per dur a terme reaccions químiques de reducció o d'oxidació com les que realitza la RNR (Bartel, 1999). Recentment s'ha proposat el metil-RNA com a intermediari entre el món de RNA i el món de DNA, ja que el fet de tenir aquest grup metil en la posició 2' de la ribosa estabilitza la molècula i la fa poc reactiva en comparació amb l'RNA (Poole, 2000).

La transició des d'un món de RNA a un de proteïna-DNA implicaria l'existència d'una traducció basada en ribosomes, la qual cosa suposaria l'establiment d'un codi genètic i la substitució de l'RNA pel DNA com a material genètic (Lazcano, 1988). La comparació bioquímica de les cèl·lules que formen els tres grans llinatges de l'arbre filogenètic (eubacteris, arqueobacteris i eucariotes) ens mostra que la major transició es va donar molt abans de la divergència de l'ancestra comú més antic (Woese, 1990).

Les RNR són enzims ancestrals presents en tots els organismes vius ja que són essencials per a la replicació i la reparació del DNA.

L'estudi de les RNR actuals junt amb el coneixement de l'evolució dels organismes sobre la Terra ens poden ajudar a determinar el tipus d'enzim més semblant a la RNR ancestral i això comportaria una millor comprensió de la transició del món de RNA al de DNA.

És evident que les RNR són enzims clau en l'evolució del material genètic que existeix actualment, sent essencial per a l'evolució de tots els organismes que hi ha sobre la Terra.

A la taula I de l'article VIII es resumeixen tots els coneixements que tenim actualment sobre la distribució de seqüències de RNR.

La seqüenciació dels genomes sencers de diferents procariotes i eucariotes ens ha permès analitzar la distribució de les RNR d'una manera no tan conservadora com s'havia fet fins al moment. Aquesta distribució es discuteix extensament a

l'article VIII però, resumidament, podem dir que tots els organismes eucariòtics i els seus corresponents virus presenten tan sols la classe Ia. En els arqueobacteris trobem majoritàriament representada la classe II i la III, mentre que la classe Ia sols la trobem en l'espècie *Halobacterium sp.*

La gran diversitat de classes en un mateix organisme es dona en el món dels eubacteris on es troba qualsevol tipus de combinació de classes (I/II, I/III i II/III).

Actualment coneixem tres classes de RNR diferents aparentment sense similitud o amb molt poca similitud entre elles, per la qual cosa podríem pensar que cada una ha aparegut independentment de les altres. Però, sorprenentment, hi ha certes similituds quant al seu mecanisme de reacció, regulació al·lostèrica i, sobretot, semblança en la seva estructura terciària que fan pensar en un possible origen comú per a totes elles (Reichard, 1993 i 1997).

Si considerem una evolució divergent des d'una RNR ancestral, ens preguntem quina és la naturalesa de l'ancestra comú (ur-reductasa) per a totes les classes de RNR?

Hem de considerar que en les primeres etapes de la vida sobre la Terra es van donar en un ambient anaeròbic estricte i, per tant, podem excloure la classe I com el tipus més primitiu. Possiblement la RNR ancestral hauria de ser més semblant a les classes II i III.

Es considera la classe III com a més ancestral a causa dels requeriments per dur a terme la reducció anaeròbica dels NTP. Així, aquesta classe sols és funcional en anaerobiosi estricte i utilitza l'AdoMet junt amb un *cluster* de ferro-sofre per generar el radical glicil. La classe II utilitza l'AdoCob per general el radical. L'AdoMet es considera estructuralment molt més simple que l'AdoCob ja que requereix per a la seva biosíntesi una maquinària enzimàtica menys complexa que l'AdoCob.

Un altre tret que reforça la classe III com la RNR més ancestral, és la utilització del format com a reductant extern en lloc del sistema de les Trx, que utilitza la classe II. Es pot veure clarament que la Trx necessita d'una sèrie d'enzims per a la seva síntesi en contraposició amb el format, que és una molècula que es troba a la natura normalment.

Per tant, i resumint el procés evolutiu que hi ha hagut en les RNR, es creu que la RNR ancestral s'assemblaria més a la RNR de classe III que trobem actualment i que, per divergència evolutiva, va donar lloc a la classe II. La classe II també va evolucionar per donar lloc a la classe I.

L'aparició de l'oxigen sobre la Terra va ser el punt clau que va impulsar aquest procés evolutiu, que va culminar amb l'aparició de les diferents classes de RNR que trobem actualment (Reichard, 1997).

Aquest procés evolutiu s'analitza extensament a l'article VIII d'aquesta tesi junt amb les hipòtesis que donen suport a la classe III com la RNR més antiga.

2. Objectius

L'objectiu global d'aquest treball ha estat aprofundir en el coneixement bioquímic i genètic de les Ribonucleotidil-Reductases (RNR) de diferents espècies bacterianes.

De forma més concreta, els objectius han estat:

1. Investigar l'essencialitat dels gens que codifiquen la RNR anaeròbica d'*E. coli* sota diferents condicions d'oxigen.
2. L'estudi bioquímic i enzimàtic de la RNR anaeròbica de *L. lactis*.
3. Determinar la naturalesa de les RNR de bacteris filogenèticament antics.
4. Clonar i purificar la RNR de *C. ammoniagenes* per tal d'establir si pertany a una de les classes descrites fins al moment o si constitueix una nova classe.
5. Estudi de la regulació de l'operó que codifica la RNR de *C. ammoniagenes*.
6. Estudi de les diferents RNR (classes Ia, II i III) de *Pseudomonas aeruginosa*.
7. Distribució dels gens que codifiquen les RNR dins el grup bacterià dels -proteobacteris.
8. Evolució de les RNR.

3. Resultats i discussió

3.1. Ribonucleotidil-Reductases de classe III (articles I i V)

3.1.1. Essencialitat dels gens *nrdDG* en condicions anaeròbiques

El genoma d'*Escherichia coli* conté els gens *nrdAB*, *nrdEF* i *nrdDG* que codifiquen per a tres RNR diferents, que funcionen en condicions aeròbiques (classes Ia, Ib) i anaeròbiques (classe III).

Fent créixer *E. coli* aeròbicament els gens *nrdAB* són essencials i només se n'han pogut obtenir mutants condicionals, com ara la soca KK450 *nrdA_{ts} nrdB1*, capaç de créixer a 30°C però no a 42°C (Fuchs, 1973). Així, els mutants en els gens *nrdAB* no poden ser complementats pels gens cromosòmics *nrdEF*. D'altra banda, un mutant per als gens *nrdEF* no té cap fenotip aparent.

L'objectiu d'aquest treball fou la construcció de mutants per als gens *nrdD* i *nrdG*, per tal d'estudiar-ne el comportament sota condicions de creixement a diferents tensions d'oxigen, així com determinar-ne l'essencialitat.

Ambdós mutants, *nrdD* i *nrdG* (construïts tal com es descriu a l'article I), eren viables sota condicions de creixement aeròbic. Contràriament al que esperàvem, quan creixien en condicions de microaerofília (sota bombolleig constant amb nitrogen o creixement en placa en gerres Gas-Pak) també s'observava un creixement semblant al que presentava la soca salvatge. Atès que les RNR de classe III només funcionen en condicions anaeròbiques i les de classe I requereixen oxigen, havíem predit que aquestes condicions de manca d'oxigen no serien prou estrictes per impedir el creixement dels mutants *nrdDG*. Va caldre assolir condicions d'anaerobiosi estricta assolida per la inclusió en el medi de cultiu de sulfur de sodi (Na₂S) com a element reductor i de resazurina com a indicador redox, per tal d'observar l'absència de creixement dels mutants *nrdDG*.

Amb aquests resultats demostràvem l'essencialitat dels gens *nrdDG* durant el creixement anaeròbic, però, per què aquests mutants eren capaços de créixer en

condicions de microaerofília? Vàrem abordar aquest interrogant mitjançant dues aproximacions diferents, una de genètica i una altra de bioquímica.

En la primera aproximació vàrem fer créixer la soca KK450 i la soca KK450 *nrdD* sobre plaques de medi LB que contenen 0, 0.3, 2 i 4 mM d'hidroxiurea (HU), i les vam incubar aeròbicament i microaeròbicament (Gas-Pak). La HU actua inhibint la RNR de classe I. Tal com es mostra a la figura 1 de l'article I, la soca KK450 és hipersensible a la HU únicament en condicions aeròbiques quan l'enzim NrdAB és el funcional. En condicions de microaerofília és l'enzim NrdDG el responsable del creixement, el qual no és sensible a la hidroxiurea. La soca KK450 *nrdD* és hipersensible a l'HU en condicions aeròbiques i microaeròbiques, la qual cosa indica que l'enzim NrdAB és el responsable del creixement microaeròbic en aquest mutant.

En l'aproximació bioquímica es va poder determinar que en extractes proteics de la soca salvatge i la soca *nrdD* crescuts aeròbicament, l'enzim NrdAB presentaven la mateixa activitat específica. En canvi, en condicions de microaerofília en la soca salvatge no es detectava aquesta activitat de la classe I, perquè la que subministra els dNTP és la classe anaeròbica. Mentrestant, el mutant *nrdD* sí que hi ha activitat RNR de classe I. Com es veu a la taula I de l'article I, en el mutant *nrdD* crescut microaeròbicament hi ha un increment en l'activitat del sistema NrdAB, quatre vegades superior a la que es dona en condicions aeròbiques, la qual cosa és deguda a un increment en la síntesi de les proteïnes NrdA i NrdB, tal com es pot observar segons transferència Western.

La transició d'un cultiu d'*E. coli* crescut aeròbicament cap al creixement anaeròbic, implica canvis transcripcionals, que comporten l'activació i desactivació d'una sèrie de gens. Aquests solen estar governats per dos reguladors transcripcionals sensibles a diferents tensions d'oxigen. Un d'ells, la proteïna FNR, actua principalment estimulants la transcripció d'una sèrie de gens en condicions anaeròbiques. L'altre, el sistema ArcAB, actua bàsicament reprimint la transcripció de gens expressats en condicions aeròbiques. Ambdós reguladors podrien actuar sobre la transcripció dels gens *nrdDG* i, possiblement, els *nrdAB*.

En aquest treball demostrem per primera vegada que els gens *nrdDG* són els responsables de la síntesi dels dNTP en condicions de microaerofília i anaerobiosi en soques salvatges. En canvi, els mutants *nrdD* no són capaços de dur a terme la

síntesi anaeròbica de dNTP i supleixen la manca de l'enzim de classe III sobreexpressant els gens *nrdAB*. A baixes tensions d'oxigen el radical tirosil no es forma de manera eficient en la proteïna NrdB. La cèl·lula contraresta aquesta deficiència amb un increment en la transcripció dels gens *nrdAB* per formar més proteïnes NrdAB.

3.1.2. Estudi enzimàtic de la RNR de classe III de *Lactococcus lactis*

Com ja s'ha comentat, la RNR de classe III va ser descoberta i estudiada extensament en *E. coli*, en menor grau, en el fag T4.

Per tal de disposar d'un nou model de RNR de classe III, diferent del d'*E. coli*, ens vàrem plantejar l'estudi de la RNR anaeròbica d'altres microorganismes, concretament de *Lactococcus lactis*. En aquest treball hem estudiat el sistema d'activació i les propietats bioquímiques de la RNR de classe III de *L. lactis*, i hem estudiat la seva regulació al·lostèrica, per veure si el model d'*E. coli* podia fer-se extensiu a altres RNR de classe III.

Ens interessava esbrinar com havia afectat la divergència evolutiva entre *E. coli* i *L. lactis* l'estructura, el sistema d'activació, el funcionament i la regulació al·lostèrica dels seus enzims de classe III respectius, ja que es creu que aquests organismes van divergir del seu ancessor comú fa més de 2 bilions d'anys.

L. lactis és un bacteri que pertany al grup de bacteris de l'àcid làctic, i s'inclou dins del grup dels Gram-positius amb baix contingut en G+C. El seu creixement es du a terme en condicions de microaerofília i anaerobiosi estricta. Aquest bacteri, a més de la RNR anaeròbica de classe III, presenta una RNR de classe Ib activa en condicions de microaerofília (Jordan, 1996).

3.1.2.1 *L. lactis* conté els gens *nrdDG*

Els gens *nrdDG* de *L. lactis* els va descobrir el Dr. G. Buist quan estava clonant el gen *acmA*, que codifica per a la peptidoglican hidrolasa més abundant d'aquest bacteri. Va aïllar un fragment d'una genoteca de *L. lactis* que contenia el gen *acmA* i dos ORF que codificaven per a dues proteïnes hipotètiques de 84.2 i 23.3 kDa que presentaven una elevada similitud amb les proteïnes NrdD i NrdG d'*E. coli*.

Aquests ORF codificaven, efectivament, per a la RNR anaeròbica (gens *nrdD* i *nrdG*) d'aquest microorganisme.

El gen *nrdD* està format per 2.2 kpb, separat per tan sols 2 pb del gen següent, el *nrdG* de 600 pb. Encara que no tenim dades experimentals, creiem que aquests dos gens formen part d'una única unitat transcripcional, i per tant, constitueixen un operó.

Per comparació amb l'extrem 3' del 16S rRNA de *L. lactis* (Chiaruttini, 1993), trobem que a 7 pb i 6 pb per davant de l'inici de traducció dels gens *nrdD* i *nrdG*, respectivament, hi ha les seqüències GAGGA i GGAG, que es corresponen amb els RBS d'aquests gens. Cal destacar que l'RBS del gen *nrdG* es troba dins del marc obert de lectura del gen *nrdD*, per tant, ha d'haver-hi una traducció acoblada.

Per comparació amb altres seqüències de consens -10 i -35 de diferents promotors caracteritzats en *L. lactis*, vam poder localitzar les caixes -10 i -35 de la possible regió promotora dels gens *nrdDG*. La seqüència TGNTA es correspondria amb la regió -10 i la seqüència GAAT, amb la regió -35.

No s'ha pogut identificar cap seqüència d'unió per a la proteïna FNR per comparació amb la seqüència de consens.

La proteïna NrdD (84.2 kDa) està formada per 747 aa i presenta una identitat del 53% amb la proteïna NrdD d'*E. coli*. *A priori* es pot veure que la seqüència conté tots els aminoàcids clau involucrats en la generació del radical proteic i en la regulació al·lostèrica, i conte totes les cisteïnes (localitzades en el centre actiu) essencials per a la reducció dels NTP (figura 21).

La proteïna NrdG (23.3 kDa) està formada per 199 aa i presenta un grau d'identitat del 42% amb la proteïna NrdG d'*E. coli*.

Com que aquest bacteri també conté els gens *nrdEF* que codifiquen per a la RNR de classe Ib, ens vam proposar determinar quin dels dos sistemes (*nrdDG* o *nrdEF*) era el responsable del creixement en condicions anaeròbiques.

Tal com es descriu en l'article V, es va construir un mutant per als gens *nrdDG*. Aquest no era capaç de créixer en condicions d'anaerobiosi estricta, si afegíem sulfur de sodi en el medi, com també vàrem descriure per a *E. coli* en l'article I. Així, demostràvem que els gens *nrdDG* són essencials per al creixement anaeròbic de *L. lactis* (figura 1, article V).

```

E. coli : -----MTPHVMKRDCCKVPFKSERIKKAILRAAKAAEVDADYCATVA-AVV : 46
L. lactis : MKTEVKYQDVTLEEINVIKRDGRSVKFNSEKLIKFDALTKAAKKVELTDKSVLSELTDRVV : 59

E. coli : SEQMQGRNQ-VDINEIQTAVENQLMSGPYKQLARAYIEYRHRDIEREKGRRLNQEIRG : 104
L. lactis : SEIFSRFSENVKIYEIQSIVEQELLESGETALAEYISYRANRDLARTKATDINFTEIK : 118

E. coli : LVEQTNASLLNENANKDSKVIPTQRDLLAGIVAKHYARQHLLPRDVVQAHERGDIHYHD : 163
L. lactis : LINR-DQTVVNEENANKDSNVFNTQRDLTAGAVSKAIGLK-LLPPHVANAHQKGDIIHYHD : 175

E. coli : LDYSPFFPMFNCLMLIDLKGMLTQGFKMGNAEIEPPKSISTATAVTAQIIAQVASHIYGG : 222
L. lactis : LDYSPFTTMANCCCLIDFKNMFENGFKLGNAQVDSPKSIQTATAQASQIIANVASSQYGG : 234

E. coli : TTINRIDEVLAPFVITASYNKHRKTAEEWNI PDAER--YANSRTIKECYDAFQSLEYEVN : 279
L. lactis : CSFDRADEVLAPYAKLNYQKHLKDAQKWIDGDEKREAYAREKTAKDIYDAMQSLEYEIN : 293

E. coli : TLHTANGQTPFVTFGFLGTSWESRLIQESILRNRIAGLGKNRKTAVFPKLVFAIRDGL : 338
L. lactis : TLFTSNGQTPFVTVGFLGDDWYAREIQKAILKVRIGGLGSEHRTAIFPKLIPTLKRGL : 352

E. coli : NHKKGDPNYDIKQLALECAASKRMPDILNYDQVVKVTGSFKTPMGCRSFLGVWENENGE : 397
L. lactis : NLEVGTPNYDIKELALECSTKRMYPDILSYDKIVELTGSFKASMGCRSFLQGWKDANGN : 411

E. coli : QIHDGRNNLGVISLNLPRIALEPKGDEATFWKLLDERLVLARKALMTR IARLEGVKARV : 456
L. lactis : DVTAGRNNLGVVTVNLPRIALEAAGNKEKFWEIFNERVEIAHDALAFRVERAKEAQPKN : 470

E. coli : APILYMEGACGVRLNADDDVSEIFKNGRASISLGYIGIHETINALFGGEHVYDNEQLRA : 515
L. lactis : APILFMNGALG-RLDSEGSVDDLYNNERATVSLGYIGLYE-VATTFYGPTWESNPEAKA : 527

E. coli : KGIAIVERLRQAVDQWKEETGYGFSLYSTPSENLCDFRCLDTAEFGVVPGVTDKGYTT : 574
L. lactis : FTIEIVKRMHEDCEDWSKASGYHYSVYSTPSESLETRDFCRMDKEKFGSVADITDKDYTT : 586

E. coli : NSFHLDVDKKNPYDKIDFEAPYPPLANGGFICYGEYPNIQHNLKALEDVWDYSYQHVP : 633
L. lactis : NSFHYDVRKNPTPFKLEFEKDYVYANGGF IHYCEYPVLQONPKALEAVWDFAYDRIG : 645

E. coli : YYGTNTPIDECYECGFTGEFECTSKGFTCPKCGNHASRVSVTRRVCCYLGSPDARPFN : 692
L. lactis : YLGTNAPIDHCYACGFEGDFTPTERGFKCPQCGNDDPKTCDVVKRTCCYLGNPQARPMV : 704
*

E. coli : AGKQEEVKRRVKHLGNGQIG----- : 712
L. lactis : HGRHKEISSRVKHM-NGSVGALNDGNLIDSVEVDEAKSKYFAEK : 747

```

Figura 21. Alineament de les proteïnes NrdD d’*E. coli* i *L. lactis*. S’hi han assenyalat en gris els aa involucrats en la catàlisi de l’enzim i en negre els que regulen l’activitat general de l’enzim (L.A.R.A). Amb un asterisc (*) s’indica el radical glicil present a l’extrem C-terminal.

3.1.2.2 Purificació i caracterització de les proteïnes NrdD i NrdG. Propietats catalítiques de l’enzim

Per obtenir un bon rendiment en la purificació de les proteïnes NrdD i NrdG de *L. lactis* vam construir soques recombinants d’*E. coli* que sobreexpressaven els gens *nrdD* i *nrdG*. Com està descrit en l’article V, vam clonar els gens *nrdDG* sota el control del promotor *lacZ* en el vector pUK21. Per a la purificació de la proteïna NrdG vam utilitzar el sistema dels pET (Novagen) i vam clonar el gen *nrdG* sota el

control del promotor de la RNA polimerasa del fag T7, present en el vector pET24a.

El clon sobreproductor per a la proteïna NrdD es va fer créixer anaeròbicament, ja que en contacte amb l'oxigen la proteïna NrdD es trenca. La proteïna NrdD pura va ser obtinguda bàsicament mitjançant una cromatografia d'afinitat d'ATP-*sepharose*.

La proteïna NrdG va ser purificada mitjançant una cromatografia de bescanvi iònic (DE52-*Whatman*) i una columna de gel filtració (*Superdex-75 26/60 prep grade*) acoblada a un FPLC. En l'article V s'expliquen amb detall ambdues purificacions.

La proteïna NrdD mostrava després de la purificació dues bandes d'una mida aproximada de 74 i 84 kDa en un gel de poliacrilamida. Aquesta doble banda és deguda al trencament de la proteïna en el radical glicil en presència d'oxigen (King, 1995). La proteïna NrdG dona una sola banda aproximadament de 25 kDa (figura 2, article V).

Per poder veure si el sistema enzimàtic és actiu s'ha de poder detectar el radical glicil. Amb aquesta finalitat, vàrem incubar la proteïna NrdD en condicions anaeròbiques i amb els components per a l'activació de la proteïna NrdD d'*E. coli*: la proteïna NrdG, AdoMet, DTT, ions potassi i un agent reductor com el DAF. Mitjançant l'espectroscòpia EPR es va poder detectar el senyal que generava el radical glicil, el qual tenia les mateixes característiques que el radical glicil que conté la proteïna NrdD o la piruvat format liasa d'*E. coli* (figura 3, article V).

Com es comenta a la introducció, la proteïna NrdG conté un *cluster* de ferro i sofre que desapareix durant la cromatografia, per tant, hem de reactivar-la amb ferro i sofre, sota condicions d'anaerobiosi estricta ja que si no el *cluster* no es forma correctament. La proteïna NrdG purificada, després de la seva reconstitució sota condicions anaeròbiques, presenta un senyal EPR típic de proteïnes que uneixen un *cluster* de ferro i sofre amb estructura [4Fe-4S]. Si la proteïna s'exposa a l'oxigen, presenta un senyal d'EPR típic de proteïnes amb un *cluster* del tipus [3Fe-4S] (Figura 4, article V). Aquest comportament de la proteïna NrdG respecte a l'oxigen ens indica la importància de les condicions anaeròbiques, a l'hora de treballar amb aquests enzims. Encara que els nostres resultats sobreestimen la quantitat de ferro mesurada colorimètricament, creiem que ha d'haver-hi un *cluster* [4Fe-4S] per a cada

cadena polipeptídica, tal com s'observa en la RNR de classe III d'*E. coli* (Tamarit, 1999).

Una de les diferències que vam trobar respecte a la RNR d'*E. coli* fou en la interacció entre ambdues subunitats. Així, les proteïnes d'*E. coli* formen un complex NrdD-NrdG molt estable en un gradient de sucrosa mentre que per a les proteïnes NrdD i NrdG de *L. lactis* no s'observa cap mena de complex. A més a més, la proteïna NrdD dimeritza () tan sols quan hi ha els efectors al·lostèrics. Tot i que no són experiments definitius, aquest fet indica que el sistema anaeròbic de *L. lactis* s'assemblaria més al sistema de la piruvat format liasa que a la classe III d'*E. coli*, ja que la proteïna activasa del sistema actua activant més d'una subunitat gran i no forma part de l'holoenzim actiu.

En estudiar els requeriments necessaris per a la seva activitat catalítica, es va veure que la reducció del CTP era dependent del DTT, format, KCl, AdoMet i ATP. S'observà que preferencialment utilitzen els ribonucleòtids trifosfat en lloc dels difosfat com a substrat (taula I, article V).

Així, la reducció dels NTP es du a terme en dues etapes: en primer lloc es produeix l'activació de la proteïna NrdD per la proteïna NrdG, AdoMet, DAF i llum. El sistema de la flavodoxina, flavodoxina reductasa i NADPH és substituït *in vitro* pel DAF i la llum. En la segona etapa ocorre la reducció dels dNTP, a través d'una reacció dependent de DTT, format (donador extern d'hidrògens), KCl i ATP (regulador al·lostèric positiu).

3.1.2.3 Regulació al·lostèrica

Com hem vist en l'apartat anterior, la reducció del CTP requereix ATP, la qual cosa indica que aquest enzim està regulat al·lostèricament.

Les RNR presenten dos llocs al·lostèrics: el L.A.R.A *activity site* i el L.A.R.E *specificity site*. Al primer s'uneix l'ATP i el dATP i al segon s'uneixen el dATP, el dGTP, el dTTP i l'ATP en les classes Ia i II, i el dATP, el dGTP, el dTTP però no l'ATP en la classe III d'*E. coli*.

Estudiant l'especificitat de substrat vam poder determinar que la reducció del CTP depèn d'ATP i no pas de dATP, la reducció de l'ATP requereix dGTP i la reducció

del GTP requereix dTTP, seguint l'esquema general de totes les RNR (vegeu la figura 3 de la introducció).

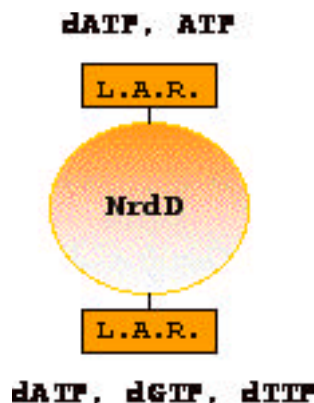
El fet més característic, demostrat per primer cop en una RNR, és el comportament al·lostèric que presenta la reducció del CTP quan és estimulat per l'ATP, ja que segueix una cinètica enzimàtica de tipus sigmoïdal, que desapareix quan s'afegeix a la reacció dGTP o dATP. Això fa pensar que existeix un alt grau de cooperativitat *cross-talk* entre els dos llocs al·lostèrics de l'enzim. La reducció de l'ATP i el GTP segueix una cinètica de tipus Michaelis-Menten (taula II i figura 7, article V).

Experiments d'unió de nucleòtids *binding* a la subunitat gran demostren que existeixen en un dímer 4 llocs d'unió per el dATP i 2 per el dGTP. En les corbes *scatchard* es torna a veure l'efecte cooperatiu que hi ha entre els llocs d'unió per el dATP. El dGTP competeix per dos llocs d'unió del dATP, i l'ATP pels altres dos. El nombre de llocs d'unió per a l'ATP no es va poder calcular, però es pot veure que el dGTP i l'ATP s'uneixen a dos llocs diferents. Els llocs d'unió del dGTP també ho eren per el dTTP i per el dATP, i no pas per a l'ATP (figura 7 i 8 de l'article V).

Si ens fixem en l'efecte sigmoïdal observat, veiem que el dGTP i el dATP s'uneixen a dos llocs de la proteïna NrdD on no s'uneix l'ATP i això provoca que incrementi enormement l'afinitat del dos llocs lliures per a l'ATP. Això explica per què desapareix l'efecte sigmoïdal de l'ATP en afegir dGTP i dATP. L'estudi de la regulació al·lostèrica i de la unió dels nucleòtids es resumeix a la figura 22. Podem fer la hipòtesi que el sistema de regulació al·lostèrica que presenta aquest enzim es podria fer extensiu al que trobaríem en totes les RNR de classe III.

En comparar filogenèticament les seqüències de diverses proteïnes NrdD (figura 9, article V), es pot veure com aquestes s'agrupen en cinc grups diferencials. Dos d'ells contenen seqüències pertanyents a bacteris Gram-positius, altres dos contenen proteïnes de bacteris Gram-negatius i, el cinquè grup correspon a arqueobacteris.

Figura 22. Esquema general d'unió dels diferents efectors a la proteïna NrdD de *L. lactis*. Aquest model es fa extensiu a totes les RNR de classe III estudiades fins al moment.



Tot i que totes les RNR presenten una estructura primària molt diferent, hi ha trets que indiquen la possible existència d'un ancestre comú a partir del qual es van originar mitjançant processos de divergència evolutiva.

El tret més important és l'alt grau de conservació en la regulació al·lostèrica d'aquests enzims, que indica una elevada similitud en l'estructura terciària (vegeu extensament l'apartat 2.5).

Es veu clarament com el sistema de *L. lactis* segueix les mateixes etapes d'activació que les que presenta la RNR anaeròbica d' *E. coli*, i aquest sistema, es pot fer extensiu a altres RNR de classe III de diferents organismes que es troben allunyats filogenèticament l'un de l'altre.

3.2. Ribonucleotidil-Reductases dependents d'AdoCob, classe II (article II)

Les RNR de classe II es caracteritzen perquè requereixen S-adenosilcobalamina (AdoCob), o vitamina B₁₂, com a cofactor per formar el radical proteic necessari per iniciar un cicle de reducció. Aquesta petita molècula actua com la subunitat petita en la classe I, o la proteïna NrdG i AdoMet en la classe III.

Des dels anys seixanta el prototip de les RNR de classe II havia estat l'enzim de *Lactobacillus leichmannii* del qual es coneixia la seva seqüència nucleotídica i les seves característiques bioquímiques i enzimàtiques.

L'objectiu inicial d'aquest treball era estudiar quin tipus de RNR tenien les espècies bacterianes filogenèticament més primitives. Per això, vàrem escollir els eubacteris *Thermotoga maritima*, *Chloroflexus aurantiacus* i *Deinococcus radiodurans*. Aquests

bacteris tenen certes peculiaritats que els fan força interessants. Així, *T. maritima* té una temperatura òptima de creixement a 80°C, *C. aurantiacus* és un organisme fotoautotròfic que creix a 50°C, i *D. radiodurans* està considerat l'organisme més resistent a tot tipus de radiacions.

3.2.1. Identificació i caracterització bioquímica de RNR de classe II present en bacteris filogenèticament primitius

Per tal de determinar quin tipus de RNR presentava cadascun d'aquests microorganismes, vam obtenir extractes crus de proteïnes a partir dels cultius bacterians crescuts en les condicions que es descriuen a l'article. En els assajos d'activitat RNR, s'obtingueren valors enzimàtics d'activitat específica de 1,8, 0,6 i 0,4 Unitats/mg de proteïna per als extractes de *T. maritima*, *C. aurantiacus* i *D. radiodurans*, respectivament, i dependent l'activitat de l'AdoCob. Això indicava que aquests bacteris presentaven una RNR de classe II.

Vàrem dur a terme la purificació de les RNR de *D. radiodurans* i *T. maritima*, mitjançant l'aplicació seqüencial de precipitació amb sulfat d'amoni, una cromatografia de bescanvi iònic (Mono Q HR 5/5 acoblada a un FPLC) i, finalment, una columna d'afinitat (*dATP-sepharosa*). Aquest procés i els resultats obtinguts es descriuen detalladament a l'article II. Les proteïnes que constitueixen la RNR de classe II a partir d'aquest treball van anomenar-se NrdJ.

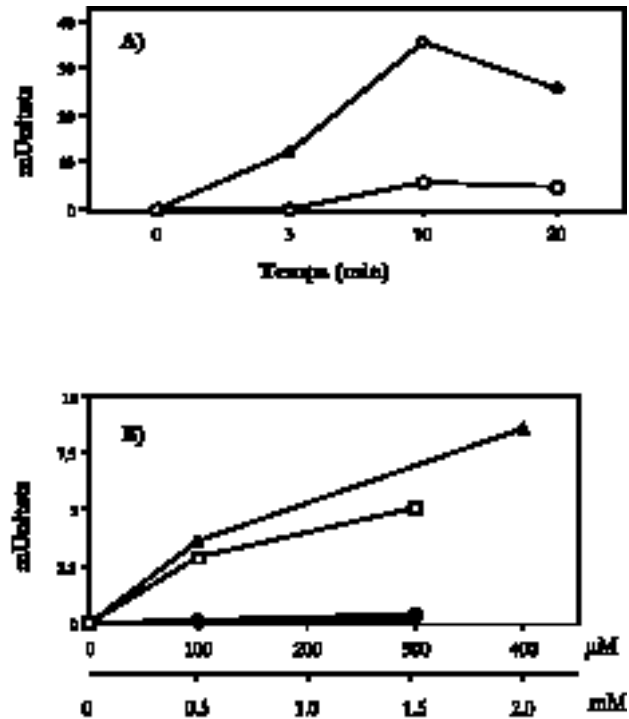
La proteïna NrdJ de *T. maritima* té un pes molecular de 90 kDa en un gel SDS-PAGE i una activitat específica, utilitzant el CDP com a substrat, de 1.100 U/mg proteïna. La proteïna NrdJ purificada de *D. radiodurans* apareix com dues bandes de 105 kDa i de 85 kDa en SDS-PAGE, amb una activitat específica entre 150-200 U/mg de proteïna, segons la preparació. Creiem que la banda de 85 kDa és deguda a processos de degradació proteolítica de la proteïna de 105 kDa.

L'enzim de *T. maritima* té una temperatura òptima de funcionament de 80°C, d'acord amb les característiques termofíliques d'aquest bacteri d'ambients extrems. La reacció és estimulada tant pel Mg^{2+} com pel Ca^{2+} . El substrat preferit per l'enzim són els ribonucleòtids difosfat. Com passa amb els altres tipus de RNR, els enzims de classe II també estan regulats al·lostèricament, de manera que el dATP i l'ATP

estimulen la reacció de reducció del CDP, i el dTTP i dGTP l'inhibeixen (figura 2 i 3, article II).

La temperatura òptima de funcionament de l'enzim de *D. radiodurans* és de 30°C i la reacció també és estimulada pels ions Mg^{2+} i Ca^{2+} . Per veure quin era el substrat preferit per aquest enzim es va realitzar una cinètica temporal utilitzant com a substrat el CTP o el CDP (figura 23a) que permet determinar que aquest enzim també utilitza com a substrat preferent els ribonucleòtids difosfat.

Figura 23. Caracterització bioquímica de l'enzim NrdJ de *D. radiodurans*. a) Comparació del CDP () i CTP (○) com a substrat en diferents durades de l'assaig d'activitat RNR. b) Estimulació de la reducció del CDP mitjançant l'addició de concentracions creixents dels efectors al·lostèrics ATP (), dATP (□), dGTP (○) i dTTP ().



Pel que fa a la regulació al·lostèrica, a la figura 23b veiem com l'ATP i el dATP estimulen la reducció del CDP, i el dTTP i el dGTP no tenen efecte.

Contràriament al que hem demostrat amb les RNR de *T. maritima* i *D. radiodurans*, la RNR de classe II *L. leichmannii* utilitza ribonucleòtids trifosfat. Així doncs, el grau de fosforilació del substrat no és un tret definitori per a la classificació de les RNR.

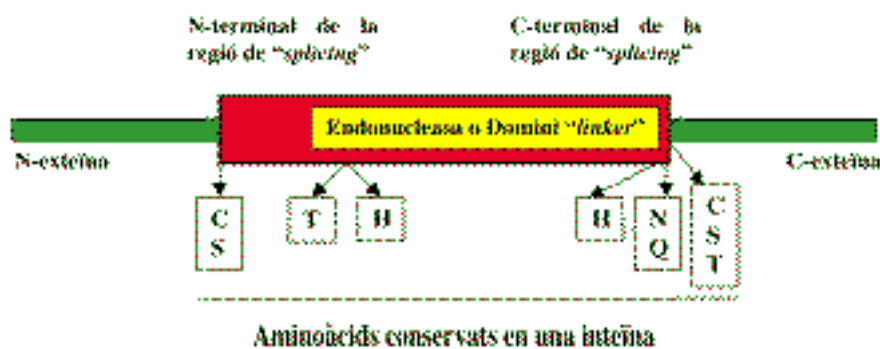
El fet que ambdós enzims siguin estimulats i no pas inhibits pel dATP ens indica que la proteïna o bé no té el lloc al·lostèric que governa l'activitat general de l'enzim o bé el té inactiu (vegeu l'apartat 1.7.1.1 de la introducció).

3.2.2. Relacions estructurals amb les classes I i III

Tal com es descriu a l'article II es varen obtenir les seqüències d'alguns dels pèptids obtinguts mitjançant les purificacions dels enzims. A partir d'aquestes seqüències, es van dissenyar *primers* degenerats i mitjançant la tècnica de PCR es va poder obtenir el gen que codificava per a la proteïna NrdJ de *T. maritima*, i una seqüència parcial del gen *nrdJ* de *D. radiodurans*. Com que la seqüència de *T. maritima* es descriu detalladament en l'article, no aprofundirem en aquest apartat.

Es va amplificar un fragment d'1.9 kpb a partir del genoma de *D. radiodurans* i aquest va ser clonat i seqüenciat. Sorprenentment aquesta seqüència tan sols presentava una certa similitud amb altres RNR. Al mateix temps que dúiem a terme la seqüenciació d'aquest gen, el TIGR (The Institut of Genomic Research) va permetre l'accés a la seqüència, encara que preliminar, del genoma complet d'aquest bacteri. La comparació d'aquest fragment d'1.9 kpb mostra que la seqüenciació era totalment correcta. Comparant aquest fragment amb la proteïna NrdJ de *Pyrococcus furiosus* (Riera, 1997), vam poder determinar la presència d'una inteïna en aquesta regió interna al gen *nrdJ* de *D. radiodurans*. Una inteïna es pot comparar a un intró però escala de la proteïna. Així, es pot definir *splicing* de proteïnes com l'escissió d'una seqüència proteica (inteïna) a partir d'una proteïna precursora amb la subsegüent lligació dels extrems proteics (exteïna) per formar una proteïna madura i lliure de la inteïna. La inteïna conté certs trets que la identifiquen, com són ara la presència d'una sèrie d'aminoàcids conservats i un domini amb activitat endonucleasa (figura 24a). Com es pot veure a la figura 24b, aquest element proteic inserit en el gen *nrdJ* de *D. radiodurans* conté tots els elements característics descrits per les inteïnes.

A)



B)

```
1 mpvsqhggkv ghrstssclt rdhqrtpccp frrrdgfpcc agalaaspss pspppsarss
61 mttapdrsap artdkttqhf denaqhiakr qylqgndgdi sgmfwriadw vagaeappear
121 qqwaqqyydl maekkfcpvg rvlagagtqh gnvlncfvqg atehdpssfe gvmevakkla
181 lvtkvvggng vnldvyrpra qssrsdngvr gwvymaeha dvqdfieglm rpptqpdgek
241 qpvsrvnrtr vvygqaispe lvasarangv qivrtlpegv tavaddmggi idaarqvaei
301 aklnieprid lsamrpegap iksgsgtssg pvsflmeifd nfiewanrga edsgpintlr
361 yvyapvlrvv rgggtrrgag matisighpd vldfltakdl dreaaegdis tfnisilvdt
421 kfwdtlqadg vwtidaqdv gkyfvpvqeg eyagtfpelp traedgakgv pvygsgipar
481 wlwdqiaqha wstgepglif ndrveysal knlgeryeir stnpCvtadt wvstafgarq

541 vqdligkdfc atvngesfsa rggfwltgvk svlkvtrrg yelrltgnhgllkvthqtrk
601 vqqtawveta tlaagdriml ndhrtvkpwa gagnfsegwl lgsligdtf ltdkarpmaa
661 lgfwgeerqa qadsaqarls klgavklwr sndeqrqrvr lssealaelg akygvvhghk
721 tltdkveggg yefyrgvlqg lfdadgsvqg tqskgsvrll aqsdlslkr aqrmlsrldi
781 msslyaerll agtstlpgdk ggsaeyptqa qheliisgsn lavfaervgf seagkaarla
841 eklagyarnl nrerfsdeiv sivpdgeeav ydvtveqvha fdangvlahncgeipltveg

901 pedlgainla ayvrsgsdfdf aafradvrte vrflddvldv nvfalednr v asqdlrrlgl
961 gvmgladali kmglrydnes grqaiydims alreeavaes erlgqergfy pvyernreqv
1021 phdprnrav ltvaptgtts mlmgvssgie pvfspfiwrk igseyralla plfvellesy
1081 papkmekdg gwdwkvtea vsenhgsvvg lsfipdalqq vfvcahdisp vdhvrmqgtv
1141 qrafddggql aanslsktin lpnsasvddv ksayeeayrt gckgitvyrd gsrqfqlst
1201 skkkakteer gsaapladsk paeapavtap vsapaaaaqp qphyerpgrl hgitdmvklt
1261 dptsghrsf lvtvnhlgn pvevmvisgr agdeanadse algrvvsial qhgvpasali
1321 htllrginggl ygsyngrlv skadliaval dtfqkdaaa plpplaggsq evapsapast
1381 gvsvdglgqe rcpvceekav ireegclkoq acgyskcg
```

Figura 24. A) Representació esquemàtica d'una inteïna. En color vermell es mostra la inteïna, en color groc la possible regió codificadora i en verd, l'exteïna. També es mostren els aminoàcids conservats i importants en l'*splicing* de totes les inteïnes. B) Seqüència proteica de la proteïna NrdJ de *Deinococcus radiodurans*. En groc es marca la regió que codifica per la inteïna i en negre es marquen els aminoàcids conservats necessaris per a l'*splicing*.

La comparació entre les seqüències dels enzims de *T. maritima* i *D. radiodurans* i de les RNR de classe II de *P. furiosus*, *T. acidophilum* i *L. leichmannii*, amb la RNR de classe Ia d'*E. coli* de la qual se'n coneix l'estructura tridimensional, es pot veure que totes elles presenten les tres cisteïnes essencials localitzades en el centre actiu i es troben situades en el mateix lloc. També estan molt conservades les cisteïnes de la part C-terminal, responsables de la transferència dels electrons des de les tioredoxines cap a les cisteïnes catalítiques del centre actiu (figures 4 i 5, article II).

Al voltant del centre actiu també hi ha un gran nombre d'aminoàcids conservats la qual cosa posa de manifest l'elevat grau de conservació en el centre actiu d'aquests enzims.

També es poden identificar els aminoàcids implicats en la regulació al·lostèrica que controla l'especificitat de l'enzim (figures 4 i 5, article II). Dos d'ells l'Asp232 i l'Arg262 (numeració de la R1A d'*E. coli*) es troben molt conservats en totes les seqüències i els altres residus, tot i que no són idèntics, presenten les mateixes propietats fisicoquímiques, sobretot la seva apolaritat.

Així, els residus del L.A.R.E i del centre actiu de les cinc RNR de classe II analitzades, són idèntics als presents en la classe Ia d'*E. coli*. Aquest fet suggereix una elevada similitud en l'estructura terciària d'aquestes dues classes, i es conserva possiblement l'estructura que es va trobar per a l'enzim de classe Ia d'*E. coli*: 10 cadenes disposades antiparal·lelament que donen lloc a un barril / . Això, una vegada més, reforça la nostra hipòtesi que totes les RNR provenen d'un ancestre comú que per divergència evolutiva va donar lloc a les tres RNR que trobem actualment.

L'arbre filogenètic de les 8 seqüències de RNR de classe II que hi havia en el moment de la nostra publicació revela certes peculiaritats. Les seqüències de *D. rariodurans* i *T. maritima* s'agrupen en un grup que està format per seqüències d'arqueobacteris. En canvi, la seqüència de *L. leichmannii* està força allunyada de totes les altres, la qual cosa demostra una vegada més que aquesta presenta una seqüència d'aminoàcids totalment atípica a la que trobem en la resta de RNR de classe II i no s'hauria de seguir considerant el prototip per als enzims d'aquesta classe, sinó més aviat la seva excepció.

3.3. Identificació i caracterització de la RNR de *Corynebacterium ammoniagenes* (articles III, VI i IX)

Corynebacterium ammoniagenes és un eubacteri Gram-positiu d'alt percentatge en G+C. La RNR d'aquest bacteri va ser aïllada per primera vegada en els anys vuitanta pel Dr. Auling i col·laboradors seus (Universitat de Hannover). Aquesta RNR purificada presentava les mateixes característiques que les RNR de classe I ja

descrites, excepte pel que fa al requeriment d'ions manganès per poder realitzar l'activitat catalítica. Es considerava que aquest ió era el responsable de generar el radical tirosil en lloc del ferro com succeeix en totes les altres RNR de classe I fins ara caracteritzades. Per raó d'aquesta diferència es va proposar que *C. ammoniagenes* era el prototip d'una nova classe (IV) de RNR.

L'objectiu d'aquest treball era determinar si realment la RNR d'aquest microorganisme era prou diferent per justificar la definició d'una nova classe. En especial, ens vam centrar a determinar la composició de l'ió metàl·lic que es troba en la subunitat petita d'aquest enzim. Des del punt de vista estructural també calia esbrinar quins són els possibles aminoàcids involucrats en lligar aquest ió.

Vam abordar aquest treball des de dos punts de vista diferents; l'un genètic, en el qual es va localitzar el gen ja que la seva seqüència seria molt informativa i no es coneixia abans, i un altre de més bioquímic, en què es van aïllar i seqüenciar alguns pèptids obtinguts a partir de l'enzim purificat.

3.3.1. Aïllament dels gens que codifiquen per a la RNR de *C. ammoniagenes*

El nostre interès era determinar els gens que codificaven per a la RNR activa d'aquest bacteri ja que la seva seqüència ens indicaria de quin tipus de RNR es tractava. Per a aquest propòsit vàrem dissenyar *primers* degenerats a partir de l'alineació de diverses seqüències de les proteïnes NrdA, NrdB, NrdE, NrdF, NrdJ i NrdD, corresponents a les tres classes de RNR, i vam realitzar amplificacions mitjançant la PCR a partir del DNA genòmic de *C. ammoniagenes*. Només obtinguérem amplificació amb els *primers* dissenyats a partir de les proteïnes NrdF. Tal com es descriu detalladament en el material i mètodes de l'article III, es va obtenir una banda d'amplificació de 297 pb amb una identitat del 60.7% respecte a la proteïna NrdF de *Salmonella typhimurium*.

Com que els gens que codifiquen per a les RNR de classe Ib conegudes fins a aquell moment es troben junts formant una única unitat transcripcional, vam construir una genoteca per l'aïllament de tots els gens d'aquest sistema. Per al criatge de la genoteca construïda vam utilitzar com a sonda el fragment amplificat de 297 pb i vam obtenir diversos clons que contenien diferents fragments corresponents als gens

nrdEF. Per hibridiació, vam aconseguir un fragment de 10 kpb que contenia tot l'operó, i es va utilitzar per a la seva completa seqüenciació.

Es van trobar cinc ORF, dels quals, quatre corresponien als gens *nrdH* (228 pb), *nrdI* (435 pb), *nrdE* (2163 pb) i *nrdF* (990 pb), i el cinquè (714 pb) corresponia a un possible factor transcripcional localitzat entre els gens *nrdE* i *nrdF*, transcribint-se en sentit contrari a tots els altres. L'organització genòmica d'aquesta regió es pot veure a la figura 1 de l'article III; es troben els gens *nrdHIE* junts, després un espai intergènic de 1.2 kpb on es localitza el ORF sense funció coneguda i finalment el gen *nrdF*.

El contingut en G+C coincidia amb el que calia esperar per a aquest bacteri. El codó d'inici de la transcripció per als gens *nrdE*, *nrdF* i *nrdI* és GTG, i ATG per al gen *nrdH*. Els possibles RBS trobats són: AAAGG per al gen *nrdH*, AAAGGAGG per al gen *nrdI*, GAAAGG per al gen *nrdE* i AGCAGGG per al gen *nrdF*. També per comparació amb altres promotors descrits del gènere *Corynebacterium* es va poder localitzar la possible caixa -10 (TATAGT box) a 111 pb per sobre de l'ATG del gen *nrdH*. A 19 pb per sobre de la caixa TATA es pot localitzar la seqüència promotora de consens -35 (TTGCAG).

La proteïna NrdH (75 aa i 8.3 kDa) correspon a la redoxina del sistema, tal i com ja es va descriure anteriorment per a *E. coli* (Jordan, 1997a). La proteïna NrdI (144 aa i 15.8 kDa) correspon a una proteïna amb funció desconeguda però present a tots els sistemes de classe Ib.

La proteïna NrdE (720 aa i 81.2 kDa) i la proteïna NrdF (329 aa i 37.9 kDa) presenten uns percentatges d'identitat del 60-70% amb les proteïnes NrdE i NrdF d'*E. coli*, i només un 35% amb les proteïnes R1A i R2B d'*E. coli*. Quan es compara amb totes les proteïnes NrdE conegudes es veu que la màxima identitat es dona amb la proteïna R1E de *Mycobacterium tuberculosis*. La proteïna NrdE conté tots els aminoàcids essencials per realitzar l'activitat catalítica de l'enzim, incloent-hi les cisteïnes del centre actiu.

El que més ens interessava era estudiar la proteïna NrdF per tal de determinar quin és l'àtom metàl·lic que té lligat. Sorprenentment, comparant la proteïna NrdF amb les proteïnes R2F d'*E. coli* i de *S. typhimurium* i la proteïna R2B d'*E. coli* (figura 3 article III), es pot veure que els sis residus que lliguen els àtoms de ferro estan presents en la mateixa posició. Per tant, la pregunta que ens fèiem era com és que

tenint una seqüència tan conservada la proteïna pugui lligar àtoms de manganès en lloc de ferro?

3.3.2. La RNR de *C. ammoniagenes* pertany a la classe Ib. Caracterització bioquímica de l'enzim

Per correlacionar els nostres resultats genètics amb els estudis bioquímics els nostres col·laboradors de la Universitat d'Estocolm (prof. Brit-Marie Sjöberg) van purificar la RNR activa d'aquest bacteri. Tal com es descriu en el material i mètodes del article III, el procés de purificació d'ambdues subunitats segueix bàsicament una precipitació amb baixa concentració de sals, una DEAE cel·lulosa i una cromatografia en gel filtració (Superdex-200). Les subunitats gran i petita es van separar mitjançant una cromatografia de bescanvi iònic Mono Q. El procés de purificació es descriu a la taula I de l'article III, i les proteïnes purificades es mostren en la figura 5. Era destacable la baixa activitat específica del sistema respecte a la qual podem trobar en altres proteïnes de classe I purificades.

Per comprovar si aquesta RNR purificada es corresponia amb els gens seqüenciats d'aquest bacteri (apartat 2.3.1), es va realitzar la seqüenciació N-terminal i de pèptids interns de les proteïnes purificades. El resultat d'aquesta seqüenciació es pot veure a la taula II. Comparant-lo amb les seqüències de proteïnes NrdE i NrdF disponibles fins al moment, vam poder observar que aquests pèptids alineaven perfectament amb totes les proteïnes de la classe Ib conegudes i es corresponien amb la seqüència de DNA obtinguda de la genoteca en el nostre laboratori.

Així doncs, si ens fixem en la seqüència primària d'aa la RNR activa de *C. ammoniagenes* pertany a la classe Ib, ja descrita anteriorment, i no pas a una nova classe de RNR.

La regulació al·lostèrica que presenta és la típica dels enzims de classe Ib i, per tant, no presenta inhibició per dATP. La reacció funciona amb DTT però l'activitat específica més gran s'obté amb la proteïna NrdH, el seu donador d'electrons natural. El grau de sensibilitat a la hidroxidreia és el que esperem per a les RNR bacterianes de classe I (figura 6, article III).

3.3.3. La RNR de *C. ammoniagenes* és dependent de ferro

Els estudis duts a terme amb la proteïna NrdF purificada de *C. ammoniagenes* han consistit a detectar mitjançant espectroscòpia atòmica quin metall presentava aquesta proteïna. El plantejament que ens vam proposar fou correlacionar el metall detectat per espectroscòpia amb l'activitat enzimàtica de l'enzim. Així, quan es purificava la RNR a partir d'un cultiu de *C. ammoniagenes* crescut en un medi en què s'afegia manganès, s'obtenia un enzim amb molt poca activitat enzimàtica i al mateix temps, obteníem una proteïna que presentava una quantitat subestequiomètrica de manganès.

Per realitzar aquest estudi, vam construir un sobreproductor de la proteïna R2F. Com es descriu en l'article VI, el gen *nrdF* es va clonar darrere del promotor de la RNA polimerasa del fag T7 present en el vector pET21 i es va transformar en la soca d'*E. coli* JM109(DE3). La sobreproducció de la proteïna es va fer fent créixer la soca en tres condicions de cultiu diferents: amb medi LB, amb medi LB suplementat amb 2mM de MnCl₂ i amb LB suplementat amb 2 mM de FeSO₄.

En la caracterització bioquímica de les diferents proteïnes R2F purificades vam trobar diferències en la composició del centre metàl·lic i en el contingut del radical tirosil. Els resultats indicaven, per primera vegada, que aquestes proteïnes contenien ferro en lloc de manganès en el centre dinuclear. La màxima activitat específica junt amb el màxim percentatge de radical tirosil format, només eren presents en les proteïnes purificades a partir de cultius crescuts en medi LB o LB suplementat amb ferro. Es varen obtenir els mateixos resultats en experiments on es reconstituïen apoproteïnes R2F de *Salmonella typhimurium* i *Corynebacterium ammoniagenes* amb Fe o Mn ja que només es formava el radical tirosil quan la proteïna estava carregada amb ferro i no pas amb manganès.

Podem concloure que aquesta proteïna és catalíticament eficient quan el ferro es troba en el centre dinuclear. Durant més de 20 anys s'ha estat considerant que aquest enzim era dependent de manganès. Això era un artefacte per raó que els bacteris Gram-positius del grup dels corinebacteris depenen de manganès per al seu creixement, la seva manca provoca l'aturada del creixement cel·lular i es produeixen alteracions en la replicació del cromosoma i danys en el DNA.

Per tant, concloem que la RNR activa de *C. ammoniagenes* pertany a la classe Ib típica ja que conté ions de ferro en el centre dinuclear de la proteïna R2F com és característic de les RNR de classe I.

3.3.4. Anàlisi transcripcional de la regió *nrdHIEF* de *C. ammoniagenes*

Una diferència important de la regió *nrd* de *C. ammoniagenes* respecte a altres RNR de classe Ib és l'organització genètica que trobem, ja que presenta una regió intergènica d'1 kpb que conté un ORF amb una possible funció transcripcional localitzada entre el gen *nrdE* i *nrdF*.

El nostre objectiu era esbrinar si la RNR de classe Ib present en aquest bacteri és única. També volíem estudiar quins eren els gens que es transcriuen en aquesta regió i quins eren els factors que indueixen o reprimeixen l'expressió d'aquests gens.

Per esbrinar si la RNR de classe Ib era l'única vàrem realitzar un anàlisi mitjançant hibridació heteròloga, utilitzant sondes de DNA per a diferents classes de RNR. No vàrem obtenir cap resultat positiu d'hibridació excepte per als gens *nrdEF* de *C. ammoniagenes* dels quals només es va obtenir una còpia. Per tant, podíem concloure que aquest bacteri conté una única còpia de la RNR de classe Ib.

Mitjançant la RT-PCR es va determinar que en aquesta regió hi havia la transcripció de tres trànscrips diferents: *nrdHIE*, *nrdF* i el que correspon a l'ORF de la regió intergènica que es transcriu en sentit contrari als altres dos. La semiquantificació d'aquests trànscrips demostra que el gen *nrdF* es transcriu 10 vegades més que el *nrdHIE*, essent aquest últim el factor limitant per a la síntesi dels dNTP.

Estudiant-ho mitjançant RT-PCR s'ha vist que es veu incrementada l'expressió dels gens *nrdHIE* i *nrdF* per l'addició d'HU, Mn, Fe i peròxid d'hidrogen en el medi de cultiu involucrant els sistemes FUR i oxidatiu de la cèl·lula.

En la regió intergènica es codifica per a una proteïna amb motius d'unió al DNA. La comparació de la proteïna deduïda en aquest ORF en indica que pertany a la família de reguladors transcripcionals GntR involucrats en la regulació del metabolisme del carboni. Mitjançant transferència *western* no s'ha vist pas que afecti l'expressió dels gens *nrd*.

La inducció per manganès ens explica per què cal la presència d'aquest per a la síntesi del DNA en el grup dels corynebacteris.

Es pot veure que el manganès entre altres coses estimula la transcripció dels gens *nrd* que suministren els dNTP necessaris per a la replicació cel·lular.

3.4. Presència de diferents RNR dins d'un mateix microorganisme (article IV)

Un dels fets més sorprenents trobats en estudiar la distribució de les RNR és sens dubte la concurrència en una mateixa espècie de diferents classes de RNR aparentment redundants funcionalment. Per raó del requeriment diferencial de les diverses RNR vers l'oxigen les condicions oxigèniques en què es desenvolupa cada cèl·lula marquen de manera important quina classe de RNR hi serà present. La lògica seria trobar organismes aeròbics que presentin la classe I o la II, organismes anaeròbics que presentin la classe II o la III, anaeròbics facultatius que tinguin la classe I i la III o la II. Però trobem també molts bacteris que tenen RNR addicionals que semblen innecessàries. Per exemple, trobem el cas dels enterobacteris que tenen la classe III, necessària per al creixement anaeròbic però que contenen també enzims aparentment reductants de les classes Ia i Ib. Quin paper juga cada enzim de la classe I, Ia i Ib en el creixement aeròbic d'*E. coli*? Aquesta és una de les preguntes que encara no està resolta.

Tanta diversitat de RNR en un mateix organisme és un problema per poder entendre l'evolució de la reducció dels ribonucleòtids.

La seqüenciació del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* ens va mostrar que aquest bacteri conté la informació genètica que codifica per a tres classes diferents de RNR (classes Ia, II i III). Ens vam plantejar estudiar si la distribució de les tres classes sols es restringia a *Pseudomonas aeruginosa* o també es donava en altres membres del grup de les *Pseudomonas* i determinar quina o quines RNR s'expressen i juguen un paper essencial durant el creixement d'aquests bacteris.

3.4.1. Distribució dels gens corresponents a les RNR de classes I, II i III en el grup de les *Pseudomonas*

El genoma de *P. aeruginosa* conté els gens *nrdAB*, *nrdJ* i *nrdDG* que codifiquen per a les RNR de classes Ia, II i III, respectivament. Per estudiar de manera sistemàtica la

presència d'aquests gens en altres espècies bacterianes es va utilitzar la tècnica d'hibridació DNA-DNA (*southern*). Vàrem utilitzar un fragment de DNA dels gens *nrdA*, *nrdJ* i *nrdD* de *P. aeruginosa* com a sondes, les quals es van marcar amb digoxigenina. Les hidridacions es van realitzar tal com es descriu en el material i mètodes de l'article V.

Els resultats obtinguts (taula I, article V) ens indiquen que moltes de les espècies analitzades presenten de forma simultània gens per a les tres classes, com és el cas de *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia cepacea*, *Hydrogenophaga flava* i *Pseudomonas sp. denitrificans*.

La coexistència de les classes Ia i II es dona en *Stenotrophomonas maltophila* i *Comamonas acidovorans*. *Comamonas testosteroni* presenta només la classe Ia i *Brevundimonas diminuta* i *B. vesicularis* presenten la classe II.

En cap cas no es va detectar hibridació positiva amb les sondes *nrdEF* corresponents als gens que codifiquen per a la classe Ib de *C. ammoniagenes* i *E. coli*. Aquests resultats demostren l'àmplia distribució que hi ha de la presència simultània de tres classes de RNR en un mateix microorganisme.

Podem pensar que l'absència de certes classes de RNR en alguns microorganismes és deguda a pressions selectives que han provocat la pèrdua d'uns gens determinats. Per veure si els gens que codifiquen per a les diferents classes s'estaven expressant contínuament, es van fer créixer els microorganismes, es van obtenir extractes crus proteics i es va assajar l'activitat enzimàtica per a les classes I, II i III.

Per diferenciar ambdues activitats es va tenir en compte el requeriment estricte que té la classe II per l'AdoCob i la sensibilitat a la hidroxidrea de la classe I. Tal com es mostra a la taula I de l'article, es va poder detectar activitat enzimàtica de classe I en *P. putida*, *P. fluorescens*, *R. pickettii*, *P. cepacea* i *C. testosteroni*. L'activitat de classe II es va detectar en *P. denitrificans*. En el cas de *P. aeruginosa* i *P. stutzeri* es va trobar simultàniament activitat RNR de classe I i II. No es va poder detectar activitat RNR de classe III per raó de l'efecte inhibitori dels extractes crus.

3.4.2. *P. aeruginosa* i *P. stutzeri* expressen la classe I i II simultàniament.

Caracterització bioquímica

Tal com es mostra a les taules I i II, es veu clarament que *P. aeruginosa* i *P. stutzeri* presenten una activitat enzimàtica de classes I i II simultàniament.

Una de les peculiaritats que presenten els enzims de classe I d'aquests bacteris és el requeriment continu d'oxigen per poder regenerar el radical tirosil i reduir els ribonucleòtids. Aquest requeriment també es dona en la RNR de ratolí. A més, trobem que hi ha un grau d'identitat més gran entre les seqüències NrdB de *P. aeruginosa* i ratolí que no pas entre la de *P. aeruginosa* i altres proteïnes NrdB procariòtiques. En altres RNR de classe I estudiades fins al moment, una vegada han estat en contacte amb l'oxigen, el radical tirosil s'ha generat, i la reducció es pot dur a terme sense la necessitat continuada de l'oxigen per generar el radical.

L'activitat enzimàtica de classes I i II requereix ions magnesi, calci, DTT i efectors al·lostèrics com el dATP i l'ATP. La classe II requereix específicament AdoCob per al seu funcionament. La classe I és un reductasa difosfat i, en canvi, la classe II és una reductasa trifosfat.

Els enzims de classe I són fortament estimulats per l'ATP i inhibits pel dATP. Quan s'afegeix dATP l'enzim de classe I de *P. stutzeri* inhibeix la seva activitat i, en canvi, la de *P. aeruginosa* no ho fa (figura 1, article IV), encara que presenta tots els aa del lloc al·lostèric que governa l'activitat general de l'enzim (Eriksson, 1997).

L'enzim de classe II de *P. stutzeri* és estimulat preferentment pel dATP i no pas per l'ATP (figura 2, article V).

Per primera vegada hem pogut demostrar la presència simultània de tres classes de RNR dins un mateix organisme i no sols això, sinó que a més les RNR de classes I i II poden estar actives simultàniament en condicions de creixement aeròbic.

Per què *Pseudomonas* utilitza les RNR de classe I i II al mateix temps? El treball genètic ens ha de permetre determinar com estan regulats els gens que codifiquen per a ambdues RNR.

3.5. Distribució i evolució de les RNR (articles VII i VIII)

3.5.1. Distribució de les RNR en el grup dels γ -proteobacteris

S'han considerat les RNR com a possibles dianes per a drogues antiproliferatives, ja que la seva inhibició produeix la mort cel·lular. Així, pot ser molt interessant esbrinar quin tipus de RNR conté un organisme i quina és la que s'està expressant en cada moment per inhibir selectivament la RNR d'un possible paràsit respecte de la RNR del seu hoste.

L'objectiu d'aquest treball va ser determinar la distribució de les RNR presents en el grup dels γ -proteobacteris, entre altres motius pel fet que molts dels seus membres són patògens humans, d'animals i de plantes.

Per estudiar la distribució dels gens de les diferents RNR vàrem seguir dues metodologies diferents, la d'hibridació i la de PCR junt amb la seqüenciació dels productes amplificats. Com es descriu en l'article, vam utilitzar sondes de diferents espècies per poder cobrir al màxim les diferències evolutives i el contingut diferencial de %G+C.

A la taula III es mostren els resultats obtinguts per als diferents bacteris utilitzats. Es pot veure que tots els enterobacteris analitzats contenen els gens *nrdAB*, *nrdEF* i els *nrdDG*. *Proteus vulgaris* i *Proteus rettgeri* únicament tenen els gens *nrdEF* i *nrdDG*. *Acinetobacter calcoaceticus* també conté els gens *nrdAB*, *nrdEF* i *nrdDG*. *Chromatium vinosum* conté els gens *nrdEF* i *nrdDG* i, en canvi, *Aeromonas hydrophila* presenta els gens *nrdJ* i *nrdDG*.

Els resultats de les amplificacions que es mostren a la taula III corroboren els resultats obtinguts en les hibridacions. La seqüenciació d'alguns d'aquests fragments ens donen percentatges de similitud que van del 100% entre els gens *nrdE* de *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*, al 60% entre *S. typhimurium* i *C. vinosum*, que presenten el grau més gran de divergència. Els fragments seqüenciats del gen *nrdA* mostren un patró d'identitat molt gran, ja que varia tan sols en un 95%. Els fragments dels gens *nrdD* ens donen un percentatge d'identitat que va des del 83% fins al 98%.

Si comparem la distribució de les RNR trobades amb la distribució filogenètica, segons el 16s rRNR, es pot veure que no hi ha cap mena de relació aparent (figura 1

article VIII) ja que en un grup tan proper filogenèticament tenen una heterogeneïtat molt gran en la distribució de les seves RNR. L'únic denominador comú en totes les espècies analitzades és la presència del gen *nrdD*. Aquest fet no ens ha de ser estrany ja que la majoria de bacteris analitzats són anaeròbics facultatius.

Però, per què un mateix organisme presenta dos tipus diferents d'enzims que funcionen en condicions aeròbiques (classes Ia i Ib)? Una possible explicació la trobem observant l'estructura tridimensional de la proteïna NrdF de *S. typhimurium*, ja que indica que aquesta presenta una accessibilitat més gran per l'oxigen al centre difèrric que la proteïna NrdB. D'aquesta manera el radical glicil pot generar-se més fàcilment. Així, la classe Ib podria funcionar en condicions de microaerofília en les quals la classe Ia no estaria totalment activa.

Tots els enterobacteris estudiats contenen les mateixes RNR, però, a excepció d'aquest grup, no es pot predir quina classe de RNR pot tenir un determinat bacteri solament amb la seva posició en l'arbre filogenètic. Possiblement la transferència horitzontal de gens, l'estil de vida i les rutes metabòliques han jugat un paper clau en la distribució de les diferents classes de RNR.

3.5.2. Evolució de les RNR

Des del descobriment de la primera RNR es creia que un organisme només contenia una sola classe de RNR. En els darrers dotze anys s'han descobert dues noves classes de RNR: la classe III (Fontecave, 1989), la classe Ib (Jordan, 1994) i noves seqüències de classe II (Jordan, 1997) amb la qual cosa trencava l'esquema general que es tenia de la distribució de les diferents RNR en un bacteri. També ha sorgit un interès sobre per què existeixen tantes classes i quina n'és la forma més primitiva.

En aquest estudi ens vam plantejar aprofundir en la distribució que hi ha de les tres classes de RNR i la seva història evolutiva per intentar resoldre quina de les tres classes és la més semblant a la RNR ancestral.

La seqüenciació de diferents microorganismes ens ha permès tenir una informació més fidedigna sobre la distribució de les diferents classes de RNR.

Vàrem buscar en els bancs de dades tots els possibles gens *nrd* i totes les proteïnes que codificaven per una RNR. A la taula I del article VIII es pot veure la distribució del les diferents classes de RNR disponibles fins al gener de 2001.

Veiem que les tres classes de RNR estan representades tan sols en els arqueobacteris i eubacteris. Tots els eucariotes tenen tan sols la classe I. Els arqueobacteris tenen les classes II i III, excepte *Archaeoglobus* i *Thermoplasma*, que tan sols contenen la classe II, i *Methanococcus* que sols té la classe III. *Halobacterium sp.* és l'única espècie d'aquest domini que té la classe I. Els eubacteris representen el grau més alt de diversitat ja que podem trobar qualsevol tipus de combinació de classes (I/II, I/III, II/III). Es pot veure que *Clostridium acetobutylicum*, *C. difficile* i *Pseudomonas aeruginosa* presenten les tres classes de RNR (I, II i III) simultàniament.

El prof. Peter Reichard (Reichard, 1997) va postular que les tres classes de RNR provindrien d'una RNR ancestral que anomenà ur-Reductasa. En aquest treball reforcem aquesta idea mitjançant diversos punts de vista. La similitud que hi ha entre les seqüències de les diferents classes es baixa, oscil·la entre el 10 i el 25%, però malgrat aquest percentatge tan baix, existeix un alt grau de similitud en les estructures terciàries de les RNR de classes I i III. Com es veu en la figura 1 de l'article VIII hi ha una conservació en l'estructura central de la proteïna que forma un / *barrel* ben definit, característic d'aquesta família de proteïnes.

En la seqüència primària hi ha trets característics comuns a totes les classes com són la presència dels aminoàcids involucrats en la regulació al·lostèrica de l'enzim (*activity* i *specificity site*) i els aa responsables d'iniciar el cicle reductiu que es localitza en el centre actiu (vegeu les figures 2a, b i c). Aquest fet estructural reforça el nexa que tenen totes les RNR, quant a la seva activitat reductiva i regulació al·lostèrica i ens indica que les tres RNR presents actualment provenen d'una RNR ancestral que per divergència evolutiva ha donat lloc a les tres classes actuals.

L'arbre filogenètic (figura 3) generat amb totes les seqüències que apareixen a la taula I (vegeu materials i mètodes) mostra que les tres classes formen *clusters* independents. Si prenem com a hipòtesi que aquestes provenen d'un ancestre comú, llavors les tres classes han d'haver aparegut independentment l'una de l'altra abans de la diversificació de l'arbre de la vida.

Veiem que les RNR de classe Ib formen un *cluster* independent respecte a les RNR de classe Ia. Les classes II i I són més similars entre elles que entre la classe III. Les seqüències víriques eucariòtiques formen un *cluster* independent respecte a les seqüències dels seus hosts. També trobem que les seqüències de classe II del mycobacteriòfag L5, Roseophage S101 i la seqüència de *Lactobacillus leichmannii*

també formen un *cluster* independent a les altres seqüències de classe II. Es pot veure clarament que la filogènia de les diferents RNR no segueix la filogènia (segons el seu 16S rRNA de les espècies analitzades, així podem dir que la transferència horitzontal dels gens *nrd* ha jugat un paper clau en la distribució i evolució de les RNR.

El nostre estudi afavoreix la hipòtesi que totes les classes de RNR que trobem actualment comparteixen un ancessor comú abans de la diversificació de la vida sobre la Terra. Aquesta Ur-RNR s'ha anat duplicant i divergint gràcies a l'adquisició de diferents adaptacions, en especial la capacitat a tolerar altes concentracions d'oxigen.

La pregunta que volíem resoldre era saber quina de les tres classes de RNR s'assemblava més a la RNR ancestral. Mitjançant un estudi *midpoint-rooting, global clock tree* i analitzant les seqüències de classes I, II i III presents a *Clostridium acetobutylicum* i *Pseudomonas aeruginosa* es va proposar la classe III com la més ancestral (vegeu la figura 6).

A continuació es detallen les consideracions estructurals, bioquímiques i evolutives que es tenen en compte a l'hora de considerar la RNR de classe III com la més ancestral.

- a) La RNR de classe III és catalíticament activa tan sols en condicions d'anaerobiosi de la mateixa manera que les formes primitives que varen existir a la Terra.
- b) La classe III utilitza S-adenosilmetionina per generar el radical glicil. Aquesta és una molècula estructuralment simple que comporta pocs passos en la seva síntesi en comparació amb la S-adenosilcobalamina, que és utilitzada per la classe II i que per ser sintetitzada requereix d'una ruta enzimàtica molt complexa.
- c) La generació del radical en la classe III necessita de la proteïna NrdG, que conté un *cluster* de ferro i sofre. Aquests *clusters* es consideren les formes més antigues i ubiqües de tots els grups prostètics. Es creu que les primeres reaccions enzimàtiques es varen donar sobre superfícies riques en sofre i ferro.
- d) El reductant extern per a les classes III és el format. Aquesta és una molècula molt simple en comparació a les Trx i Grx, que utilitzen les classes II i I.
- e) La RNR de classe III s'assembla a la piruvat format liasa. Aquest enzim és de gran importància en el metabolisme anaeròbic i és considerat una proteïna filogenèticament molt primitiva.

Podem dir que la història evolutiva de les RNR comença amb una forma primitiva de la classe III, on sols és catalíticament activa en condicions de total anaerobiosi. Posteriorment va començar l'aparició de l'oxigen sobre la Terra, que inactivà la classe III. Així, va aparèixer la classe II a partir d'una seqüència de classe III duplicada que ha perdut el radical glicil i ha adquirit un domini C-terminal amb capacitat d'unir l'AdoCob. Aquesta pot funcionar tant en presència com en absència d'oxigen. Possiblement petites traces d'oxigen, a causa de la fotòlisi de l'aigua, podrien haver forçat la divergència de la classe III. Més endavant va aparèixer la classe I, que és estructuralment i bioquímicament més complexa i tolera les concentracions actuals d'oxigen presents a la Terra.

