

4. Conclusions

1. Els gens *nrdDG* són essencials per al creixement d'*Escherichia coli* en condicions d'anaerobiosi estricta. La inesperada viabilitat dels mutants *nrdDG* sota condicions de microaerofília ve determinada per l'increment en l'expressió dels gens *nrdAB*.

2. Els gens *nrdD* i *nrdG* de *Lactococcus lactis* són essencials per al creixement anaeròbic. Aquests gens presenten un 53% i un 43% d'identitat vers els seus homòlegs d'*E. coli*. Les proteïnes corresponents, NrdD i NrdG formen un sistema enzimàtic actiu en condicions anaeròbiques, on la reducció dels NTP es realitza en dues etapes. En la primera té lloc la generació del radical glicil en la proteïna NrdD, mitjançant un procés dependent de la proteïna NrdG, adenosilmetionina, DTT i un sistema reductor que, *in vivo*, correspon al sistema de la flavodoxina i flavodoxina reductasa, i que *in vitro* se substitueix pel DAF i llum. En la segona etapa la proteïna NrdD activada redueix els ribonucleòtids en una reacció dependent de format, KCl i ATP.

3. El sistema anaeròbic de *L. lactis* està regulat al·lostèricament i es troben dos llocs d'unió per als efectors. D'una banda, el lloc que regula l'especificitat per al substrat unint dATP, dGTP i dTTP i, de l'altra, el lloc que regula l'activitat general de l'enzim que uneix dATP per inhibir-la i ATP per activar-la.

4. La unió de l'ATP presenta una cinètica sigmoïdal i es troba un alt grau de cooperativitat i comunicació entre els dos llocs al·lostèrics, un d'especificitat i un d'activitat malgrat que estiguin allunyats més de 15Å de distància.

5. La ribonucleotidil difosfat reductasa activa de *Deinococcus radiodurans* és dependent d'AdoCob (classe II). L'enzim purificat té 90 kDa i requereix per a la reacció ions calci i magnesi. Està regulat al·lostèricament i tant el dATP com l'ATP són estimuladors positius de la reacció.

6. A partir de pèptids obtinguts per la RNR de classe II purificada de *D. radiodurans* s'ha obtingut la seqüència del gen *nrdJ*. Aquesta presenta un ORF que codifica per a una hipotètica proteïna de 992 aa i 131 kDa. La diferència de grandària entre la

proteïna hipotètica i la purificada és deguda a la presència d'una inteïna en l'extrem N-terminal que, un cop s'ha processat, dona lloc a un enzim actiu i funcional.

7. Els enzims de classe II de *D. radiodurans* i *Thermotoga maritima* són estructuralment molt similars als enzims de classe I, ja que presenten tots els aa implicats en la regulació al·lostèrica, l'activitat catalítica i l'activitat *redox* de l'enzim. Aquesta similitud és deguda a la semblança en l'estructura terciària, la qual cosa reforça la idea que les RNR provenen d'un ancestre comú que per divergència evolutiva hauria originat les tres classes de RNR actuals.

8. *Corynebacterium ammoniagenes* conté els gens *nrdH* (228 pb), *nrdI* (435pb), *nrdE* (2163 pb) i *nrdF* (990 pb) que codifiquen per a la RNR activa de classe Ib. L'expressió d'aquests gens produeix un sistema enzimàtic actiu ($\alpha_2 \beta_2$) sensible a la hidroxidreïna, dependent del sistema reductor de la proteïna NrdH i que no s'inhibeix al·lostèricament per al dATP, com passa amb altres enzims de la classe Ib.

9. Malgrat s'ha considerat durant cert temps que la RNR de *C. ammoniagenes* era dependent de manganès (classe IV) hem demostrat que el metall que uneix la seva subunitat petita R2F és el ferro. A més, aquest enzim és catalíticament actiu només quan és el ferro el metall unit al seu centre dinuclear i el manganès no és capaç de dur a terme l'activació. Tot plegat ens ha permès classificar la RNR de *C. ammoniagenes* en la classe Ib.

10. Els gens *nrdHIE* i *nrdF* es transcriuen a partir de promotors independents, i el nivell transcripcional del transcrit *nrdF* és 10 vegades superior al *nrdHIE*. Així, el producte de *nrdHIE* és, doncs, el factor limitant per a la síntesi dels dNTP. Els nivells transcripcionals d'aquests sistemes es veuen incrementats amb la presència d'HU, Fe, Mn i peròxid d'hidrogen. Aquesta resposta implicaria la participació de factors transcripcionals com fora FUR/DtxR i OxyR/SoxRS.

11. A l'espai intergènic que es troba entre els gens *nrdE* i *nrdF* de *C. ammoniagenes* hi trobem un gen en sentit contrari, la seqüència d'aa derivada del qual presenta un elevat grau de similitud amb reguladors transcripcionals de la família GntR, implicats en la regulació del metabolisme del carboni. Aquest gen no sembla que estigui implicat en la transcripció dels gens *nrdF* i *nrdHIE*.

12. *Pseudomonas aeruginosa* conté els gens que codifiquen per a RNR de classes I, II i III. Extractes cel·lulars d'aquests bacteris creixent aeròbicament presenten activitat enzimàtica de classes I i II. És el primer cop que simultàniament es detecta activitat per a dos enzims que participen en el mateix procés de reducció dels NTP en un mateix microorganisme.

13. La distribució dels gens que codifiquen per a les RNR en el grup dels *-proteobacteris* és molt heterogènia encara que sigui un grup filogenèticament relacionat. L'única RNR comuna en totes les espècies analitzades és la codificada per als gens *nrdDG*, la qual cosa s'atribueix al caràcter ancestral d'aquesta classe.

14. L'anàlisi filogenètica de les seqüències aminoacídiques de diferents RNR demostra que són enzims que provenen d'un ancestre comú i la classe III és la que presenta trets més propers a aquest hipotètic ancessor comú. Aquesta forma primitiva hauria donat lloc a les tres classes de RNR que trobem actualment mitjançant processos de divergència evolutiva.

5. Bibliografia

- Åberg, A., Hahne, S., Karlsson, M., Larsson, Å., Ormö, M., Åhgren, A. i Sjöberg, B-M. (1989). Evidence for two different classes of redox-active cysteines in ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264, 12249-12252
- Allard, P., Barra, A.L., Andersson, K.K., Schmidt, P.P., Atta, M. i Fräslund, A. (1996). Characterization of a new tyrosyl free radical in *Salmonella typhimurium* ribonucleotide reductase with EPR at 9.45 and 245 GHz. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 895-896
- Andersson, J., Westman, M., Sahlin, M. i Sjöberg, B.M. (2000). Cysteines involved in radical generation and catalysis of class III anaerobic ribonucleotide reductase. A protein engineering study of bacteriophage T4 NrdD. *J. Biol. Chem.* 275, 19449-19455
- Andersson, M.E., Högbom, M., RinaldoMatthis, A., Andersson, K.K., Sjöberg, B-M. i Nordlund, P. (1999). The crystal structure of an azide complex of the diferrous R2 subunit of ribonucleotide reductase displays a novel carboxylate shift with important mechanistic implications for diiron-catalyzed oxygen activation. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2346-2352
- Åslund, F., Ehn, B., Miranda-Vizuete, A., Pueyo, C. i Holmgren, A. (1994). Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*. Glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 9813-9817
- Åslund, F. i Beckwith, J. (1999). The Thioredoxin superfamily: Redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181, 1375-1379
- Atkin, C.L., Thelander, L., Reichard, P. i Lang, G. (1973). Iron and free radical in ribonucleotide reductase. Exchange of iron and mössbauer spectroscopy of the protein B2 subunit of the *Escherichia coli* enzyme. *J. Biol. Chem.* 248, 7464-7472
- Augustin, L.B., Jacobson, B.A. i Fuchs, J.A. (1994). *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the nrd promoter region and affect expression of an nrd-lac fusion. *J. Bacteriol.* 176, 378-387
- Bartel, D.P. i Unrau, P.J. (1999). Constructing and RNA world. *TIBS*:24, M9-M13.
- Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, K., Knappe, J., Schultz, S. i Volker Wagner, A. F. (1999). Structure and mechanism of the glycy radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat. Struct. Biol.* 6, 969-975

- Bianchi, V., Eliasson, R., Fontecave, M., Mulliez, E., Hoover, D.M., Matthews, R.G. i Reichard, P. (1993a). Flavodoxin is required for the activation of the anaerobic ribonucleotide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 792-797
- Bianchi, V., Reichard, P., Eliasson, R., Pontis, E., Krook, M., Jörnvall, H. i Haggård-Ljungquist, E. (1993b). *Escherichia coli* ferredoxin NADP⁺-reductase:activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the (fpr), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* 175, 1590-1595
- Björklund, S., Skog, S., Tribukait, B. i Thelander, L. (1990). S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry.* 29, 5452-5458
- Blakley, R.L. i Barker, H.A. (1964). Cobamine stimulation of the reduction of ribotides to deoxyribotides in *Lactobacillus leichmannii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10, 391-397
- Bollinger, J.M., Edmondson, D.E., Huynh, B.H., Filley, J., Norton, J.R. i Stubbe, J. (1991). Mechanism of assembly of the tyrosyl radical-dinuclear iron cluster cofactor of ribonucleotide reductase. *Science.* 253, 292-298
- Bollinger, J.M., Krebs, C., Vicol, A., Chen, S.X., Ley, B.A., Edmondson, D.E. i Huynh, B.H. (1998). Engineering the diiron site of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2 to accumulate an intermediate similar to H-peroxo, the putative peroxodiiron(III) complex from the methane monooxygenase catalytic cycle. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 1094-1095
- Booker, S., Licht, S., Broderick, J. i Stubbe, J. (1994). Coenzyme B12-dependent ribonucleotide reductase:evidence for the participation of five cysteine residues in ribonucleotide reduction. *Biochemistry.* 33, 12676-12685
- Breidbach, T., Krauth-Siegel,R.L. i Steverding, D. (2000). Ribonucleotide reductase is regulated via R2 subunit during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.* 473, 212-216
- Brown, N.C., Canellakis, Z.N., Lundin, B., Reichard, P. i Thelander, L. (1969a). Ribonucleoside diphosphate reductase. Purification of the two subunits, proteins B1 and B2. *Eur. J. Biochem.* 9, 561-573
- Brown, N.C. i Reichard, P. (1969b). Ribonucleoside diphosphate reductase. Formation of active and inactive complexes of proteins B1 and B2. *J. Mol. Biol.* 46, 25-38
- Brown, N.C. i Reichard, P. (1969c). Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J. Mol. Biol.* 46, 39-55
- Carlson, J., Fuchs, J.A. i Messing, J. (1984). Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4294-4297
- Chabes, A., Domkin, V. i Thelander, L. (1999). Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 274, 36679-36683

- Chabes, A. i Thelander, L. (2000a). Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J. Biol. Chem.* 275, 17747-17753
- Chabes, A., Domkin, V., Larsson, G., Liu, A., Gräslund, A., Wijmenga, S. i Thelander, L. (2000b). Yeast ribonucleotide reductase has a heterodimeric iron-radical-containing subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2474-2479
- Chiaruttini, C. i Milet, M. (1993). Gene organization, primary structure and RNA processing analysis of a ribosomal RNA operon in *Lactococcus lactis*. *J. Mol. Biol.* 230, 57-76
- Ehrenberg, A. i Reichard, P. (1972). Electron spin resonance of the iron-containing protein B2 from ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 247, 3485-3488
- Eichhorn, G.L., Tarien, E. i Butzow, J.J. (1971) Interaction of metal ions with nucleic acids and related compounds. XVI. Specific cleavage effects in the depolymerization of ribonucleic acids by zinc (II) ions. *Biochemistry.* 10, 2014-2019
- Ekberg, M., Sahlin, M., Eriksson, M. i Sjöberg, B-M. (1996). Two conserved tyrosine residues in protein R1 participate in an intermolecular electron transfer in ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 271, 20655-20659
- Ekberg, M., Pötsch, S., Sandin, E., Thunnissen, M., Nordlund, P., Sahlin, M. i Sjöberg, B-M. (1998). Preserved catalytic activity in an engineered ribonucleotide reductase R2 protein with a nonphysiological radical transfer pathway. The importance of hydrogen bond connections between the participating residues. *J. Biol. Chem.* 273, 21003-21008
- Eklund, H. i Fontecave, M. (1999). Glycyl radical enzymes: a conservative structural basis for radicals. *Structure. Fold. Des.* 7, R257-R262
- Eliasson, R., Jörnvall, H. i Reichard, P. (1986). Superoxide dismutase participates in the enzymatic formation of the tyrosine radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 2373-2377
- Eliasson, R., Fontecave, M., Jörnvall, H., Krook, M., Pontis, E. i Reichard, P. (1990). The anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase from *Escherichia coli* requires S-adenosylmethionine as a cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 3314-3318
- Eliasson, R., Pontis, E., Sun, X. i Reichard, P. (1994). Allosteric control of the substrate specificity of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269, 26052-26057
- Eliasson, R., Pontis, E., Jordan, A. i Reichard, P. (1996). Allosteric regulation of the third ribonucleotide reductase (NrDEF enzyme) from enterobacteriaceae. *J. Biol. Chem.* 271, 26582-26587
- Eliasson, R., Pontis, E., Jordan, A. i Reichard, P. (1999). Allosteric control of three B₁₂-dependent (class II) ribonucleotide reductases. Implications for the evolution of ribonucleotide reduction. *J. Biol. Chem.* 274, 7182-7189

- Elledge, S.J. i Davis, R.W. (1990). Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes. Dev.* 4, 740-751
- Engström, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L. i Tribukait, B. (1985). Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J. Biol. Chem.* 260, 9114-9116
- Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Regnstrom, K., Sjöberg, B-M. i Eklund, H. (1997). Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure.* 5, 1077-1092
- Eriksson, M. (1998a). Allostery and catalysis in ribonucleotide reductase: a crystallographic investigation. Swedish University of Agricultural Sciences. Tesi Doctoral.
- Eriksson, M., Jordan, A. i Eklund, H. (1998b). Structure of *Salmonella typhimurium nrdF* ribonucleotide reductase in its oxidized and reduced forms. *Biochemistry.* 37, 13359-13369
- Eriksson, S., Sjöberg, B-M. i Hahnes. (1977). Ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*. An immunological assay and a novel purification from an overproducing strain lysogenic for phage lambda-nrd. *J. Biol. Chem.* 252, 6132-61328
- Eriksson, S., Gräslund, A., Skog, S., Thelander, L. i Tribukait, B. (1984). Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by the novo protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 259, 11695-11700
- Escolar, L., Perez-Martin, J. I de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223-6229
- Fieschi, F., Torrents, E., Touloukhonova, L., Jordan, A., Hellman, U., Barbe, J., Gibert, I., Karlsson, M. i Sjöberg, B-M. (1998). The manganese-containing ribonucleotide reductase from *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. *J. Biol. Chem.* 273, 4329-4337
- Filatov, D. i Thelander, L. (1995). Role of a proximal NF-Y binding promoter element in S phase-specific expression of mouse ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 270, 25239-25243
- Fontecave, M., Eliasson, R. i Reichard, P. (1987). NAD(P)H: Flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*: A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 262, 12325-12331
- Fontecave, M., Eliasson, R. i Reichard, P. (1989a). Enzymatic regulation of the radical content of the small subunit of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase involving reduction of its redox centers. *J. Biol. Chem.* 264, 9164-9170
- Fontecave, M., Eliasson, R. i Reichard, P. (1989b). Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2147-2151

- Fontecave, M., Nordlund, P., Eklund, H. Reichard, P. (1992). The redox centers of ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 65, 147-183
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., *et al.* (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*. 270, 397-403
- Fuchs, J.A. i Karlströmg, H.O. (1973). A mutant of *Escherichia coli* defective in ribonucleoside diphosphate reductase. Characterization of the enzymatic defect. *Eur. J. Biochem.* 32, 457-462
- Fuchs, J.A. i Karlströmg, H.O. (1976). Mapping of *nrdA* and *nrdB* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 128, 810-814
- Fuchs, J.A. (1977). Coordinate control of the synthesis of ribonucleoside diphosphate reductase components in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 130, 957-959
- Gallardo-Madueño, R., Leal, J.F.M., Dorado, G., Holmgren, A., López-Barea, J. i Pueyo, C. (1998). *In vivo* transcription of *nrdAB* operon and of *grxA* and *fpg* genes is triggered in *Escherichia coli* lacking both tioredoxin and glutaredoxin 1 or thioredoxin and glutathione, respectively. *J. Biol. Chem.* 273, 18382-18388
- Gilbert, W. (1986). The RNA world. *Nature* 339, 618
- Gleason, F.K. i Holmgren, A. (1988). Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 54, 271-97
- Hammarsten, E.P., Reichard, P. i Saluste, E. (1950). Pyrimidine nucleosides as precursors of pyrimidines in polynucleotides. *J. Biol. Chem.* 183, 105-109
- Hantke, K. (1988). Characterization of an iron sensitive Mud1 mutant in *Escherichia coli* lacking the ribonucleotide reductase subunit R2. *Arch. Microbiol.* 149, 344-349
- Harder, J., Eliasson, R., Pontis, E., Ballinger, M.D. i Reichard, P. (1992). Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by S-adenosylmethionine. *J. Biol. Chem.* 267, 25548-25552
- Harder, J. (1993). Ribonucleotide reductases and their occurrence in microorganisms: a link to the RNA/DNA transition. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 273-292
- Higgins, C.F., McLaren, R.S. i Newbury, S.F. (1988). Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: evolution by gene conversion ?-a review. *Gene*. 72, 3-14
- Himo, F., Gräslund, A. i Eriksson, L.A. (1997). Density functional calculations on model tyrosyl radicals. *Biophys. J.* 72, 1556-1567
- Hofer, A., Ekanem, J.T. i Thelander, L. (1998). Allosteric regulation of *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductases studied in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 34098-34104

- Hogenkamp, H.P., Follmann, H. i Tauer, R.K. (1987). Ribonucleotide reductase in cell extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEBS Lett.* 219, 197-201
- Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2275-2279
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237-271
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966
- Höög, J.O., von Barh-Lindström, H., Jörnvall, H. i Holmgren, A. (1986). Cloning and expression of the glutaredoxin (*grx*) gene of *Escherichia coli*. *Gene.* 43, 13-21
- Huang, M., Zhou, Z. i Elledge, S.J. (1998). The DNA transcription and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell.* 94, 595-605
- Jacobson, B.A. i Fuchs, J.A. (1998a). Multiple *cis*-acting sites positively regulate *Escherichia coli nrd* expression. *Mol. Microbiol.* 28, 1315-1322
- Jacobson, B.A. i Fuchs, J.A. (1998b). A 45 pb inverted repeat is required for cell cycle regulation of the *Escherichia coli nrd* operon. *Mol. Microbiol.* 28, 1307-1314
- Jordan, A., Gibert, I. i Barbe, J. (1994a). Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. *J. Bacteriol.* 176, 3420-3427
- Jordan, A., Pontis, E., Atta, M., Krook, M., Gibert, I., Barbe, J. i Reichard, P. (1994b). A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*. Characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 12892-12896
- Jordan, A., Pontis, E., Åslund, F., Hellman, U., Gibert, I. i Reichard, P. (1996a). The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lastis*. characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. *J. Biol. Chem.* 271, 8779-8785
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I. i Barbe, J. (1996b). Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* 19, 777-790
- Jordan, A., Åslund, F., Pontis, E., Reichard, P. i Holmgren, A. (1997a). Characterization of *Escherichia coli* NrdH. A glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J. Biol. Chem.* 272, 18044-18050
- Jordan, A., Torrents, E., Jeanthon, C., Eliasson, R., Hellman, U., Wernstedt, C., Barbe, J., Gibert, I., Reichard, P. (1997b). 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
- Jordan, A. i Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 71-98

- Joyce, G.F. (1986). RNA evolution and the origins of life. *Nature*. 338, 217-224
- Kauppi, B., Nielsen, B.B., Ramaswamy, S., Kjoller Larsen, I., Thelander, M., Thelander, L. i Eklund, H. (1996). The three-dimensional structure of mammalian ribonucleotide reductase protein R2 reveals a more-accessible iron-radical site than *Escherichia coli* R2. *J. Mol. Biol.* 262, 706-720
- Kiley, P.J. i Helmut, B. (1999). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 341-352
- King, D. i Reichard, P. (1995). Mass spectrometry determination of the radical scission site in the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 731-735
- Knappe, J. i Sawers, G. (1990). A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 383-398
- Kunz, B.A. i Kohalmi, S.E. (1991). Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. *Annu. Rev. Genet.* 25, 339-359
- Larsson, A. i Reichard, P. (1966a). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IX. Allosteric effects in the reduction of pyrimidine ribonucleotides by the ribonucleoside diphosphate reductase system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 241, 2533-2539
- Larsson, A. i Reichard, P. (1966b). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. X. Reduction of purine ribonucleotides; allosteric behavior and substrate specificity of the enzyme system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 241, 2540-2549
- Larsson, A. (1984). Overproduction of the B1 subunit of ribonucleotide reductase with gene amplification. *Acta Chem Scand.* 38, 905-907
- Larsson, A. i Sjöberg, B-M. (1986). Identification of the stable free radical tyrosine residue in ribonucleotide reductase. *EMBO J.* 5, 2037-2040
- Laurent, T.C., Moore, E.C. i Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239, 3436-3444
- Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis, L. I Oró, J. (1988) The evolutionary transition from RNA to DNA in early cells. *J. Mol. Evol.* 27, 283-290
- Lewin, R. (1986). RNA catalysis gives fresh perspective on the origin of life. *Science*, 231, 545-546
- Lewin, B. (1990). Genes IV. Cell Press. Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2 6DP. 113-114
- Licht, S., Gerfen, G.J. i Stubbe, J. (1996). Thyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science*. 271, 477-481

- Lim, C.J., Geraghty, D. i Fuchs, J.A. (1985). Cloning and nucleotide sequence of the *trxA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 163, 311-316
- Lin, A.N., Ashley, G.W. i Stubbe, J. (1987). Location of redox-active thiols of ribonucleotide reductases: sequence similarity between the *Escherichia coli* and *Lactobacillus leichmannii* enzymes. *Biochemistry.* 26, 6905-6909
- Logan, D., Andersson, J., Sjöberg, B-M. i Nordlund, P. (1999). A glycil radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science.* 283, 1499-1504
- Mann, G.J., Musgrove, E.A., Fox, R.M. i Thelander, L. (1988). Ribonucleotide reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. *Cancer. Res.* 48, 5151-5156
- Miranda-Vizuet, A., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J.A. i Spyrou, G. (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 30841-30847
- Mao, S.S., Holler, T.P., Yu, G.X., Bollinger, J.M., Booker, S., Johnston, M.I. i Stubbe, J. (1992). A model for the role of multiple cystein residues involved in ribonucleotide reduction – Amazing and still confusing. *Biochemistry.* 31, 9733-9743
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.J., Holmgren, A. i Pueyo, C. (2001). Expression analysis of the *nrpHIEF* operon form *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* En prensa.
- Moore, E.C., Reichard, P. i Thelander, L. (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. V. Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 239, 3445-3451
- Mulliez, E., Fontecave, M., Gaillard, J. i Reichard, P. (1993). An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268, 2296-2299
- Mulliez, E., Ollagnier, S., Fontecave, M., Eliasson, R. i Reichard, P. (1995). Formate is the hydrogen donor for the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8759-8762
- Noller, H.F., Hoffarth, V. i Ziminiak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science.* 256, 1416-1419
- Nordlund, P., Sjöberg, B-M. i Eklund, H. (1990). Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase. *Nature.* 345, 593-598
- Nordlund, P. i Eklund, H. (1993). Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J. Mol. Biol.* 232, 123-164
- Ochiai, E., Mann, G.J., Gräslund, A. i Thelander, L. (1990). Tyrosyl free radical formation in the small subunit of mouse ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 265, 15758-15761

- Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, E., Fontecave, M. i Reichard, P. (1996). The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J. Biol. Chem.* 271, 9410-9416
- Ormö, M., Regnström, K., Wang, Z.G., Que, L., Sahlin, M. i Sjöberg, B-M. (1995). Residues important for radical stability in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 6570-6576
- Pace, N i Marsh, T. (1985) RNA catalysis and the origin of life. *Origins Life* 16, 97-116
- Padovani, D., Mulliez, E. i Fontecave, M. (2001). Activation of class III ribonucleotide reductase by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 276, 9587-9589
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R. i Blakley, R.L. (1972). A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain.. Ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Biochemistry.* 11, 2378-2388
- Platz, A. i Sjöberg, B-M. (1980). Construction and characterization of hybrid plasmids containing the *Escherichia coli nrd* region. *J. Bacteriol.* 143, 561-568
- Petersson, B.O., Gräslund, A., Ehrenberg, A., Sjöberg, B-M. i Reichard, P. (1980). The iron center in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, 6706-6712
- Persson, A.L., Eriksson, M., Katterle, B., Pötsch, S., Sahlin, M. I Sjöberg, B-M. (1997). A new mechanism-based radical intermediate in a mutant R1 protein affecting the catalytically essential Glu⁴⁴¹ in *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 272, 31533-31541
- Poole, A., Penny, D., Sjöberg, B-M. (2000). Methyl-RNA: an evolutionary bridge between RNA and DNA ?. *Chem & Biol.* 7, R207-R216
- Reichard, P. i Rutberg, L. (1951). Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J. Biol. Chem.* 188, 839-846
- Reichard, P. i Rutberg, L. (1960). Formation of deoxycytidine 5'-phosphate from cytidine 5'-phosphate with enzymes from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 37, 554-555
- Reichard, P., Canellakis, Z.N. i Canellakis, E.S. (1961). Studies on a possible regulatory mechanism for the biosynthesis of deoxyribonucleid acid. *J. Biol. Chem.* 236, 2514-2519
- Reichard, P. (1962). Enzymatic synthsis of deoxyribonucleotides: I. Formation of deoxycitidine diphosphate from cytidine diphosphate with enzymes from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 237, 3513-3519
- Reichard, P. (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases?. *Science.* 260, 1773-1777
- Reichard, P. (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Tibs* 22, 81-85

- Reichard, P., Eliasson, R., Ingemarson, R. i Thelander, L. (2000). Cross-talk between the allosteric effector-binding sites in mouse ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 275, 33021-33026
- Riera, J., Robb, F.T., Weiss, R i Fontecave, M. (1997). Ribonucleotide reductase in the archaeon *Pyrococcus furiosus*. A critical enzyme in the evolution of DNA genomes?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 475-478
- Sawers, G. (1999). The aerobic/anaerobic interface. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 181-187
- Sjöberg, B-M., Reichard, P., Gräslund, A. i Ehrenberg, A. (1977). Nature of the free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252, 536-541
- Sjöberg, B-M., Reichard, P., Gräslund, A. i Ehrenberg, A. (1978). The tyrosine free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 6863-6865
- Sjöberg, B-M. (1994). The ribonucleotide reductase jigsaw puzzle: a large piece falls into place. *Structure.* 2, 793-796
- Sjöberg, B-M. (1997). Ribonucleotide reductases - A group of enzymes with different metallosites and similar reaction mechanism. *Structure and Bonding.* 88, 139-173
- Smith, D.G., Doucette-Stamm, L.A., *et al.* (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* H: Funtional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* 179, 7135-7155
- Stubbe, J. i Ackles, D. (1980). On the mechanism of ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*. Evidence for 3-C-H bond cleavage. *J. Biol. Chem.* 255, 8027-8030
- Stubbe, J. (1998). Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 2723-2724
- Sturgeon, B.E., Burdi, D., Chen, S.H., Huynh, B.H., Edmondson, D.E., Stubbe, J. i Hoffman, B.M. (1996). Reconsideration of X, the diiron intermediate formed during cofactor assembly in *E. coli* ribonucleotide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7551-7557
- Sun, L. i Fuchs, J.A. (1992). *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol. Biol. Cell.* 3, 1095-1105
- Sun, L, Jacobson, B.A., Dien, B.S., Srienc, F. i Fuchs, J.A. (1994a). Cell cycle regulation of the *Escherichia coli nrd* operon requirement for a *cis*-acting upstream AT-rich sequence. *J. Bacteriol.* 176, 2415-2426
- Sun, L. i Fuchs, J.A. (1994b). Regulation of the *Escherichia coli nrd* operon: role of DNA supercoiling. *J. Bacteriol.* 176, 4617-4626

- Sun, X., Harder, J., Krook, M., Jörnvall, H., Sjöberg, B-M. i Reichard, P. (1993). A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: Nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 577-581
- Sun, X., Eliasson, R., Pontis, E., Andersson, J., Buist, G., Sjöberg, B-M. i Reichard, P. (1995). Generation of the glycy radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *J. Biol. Chem.* 270, 2443-2446
- Sun, X., Ollagnier, S., Schmidt, P.P., Atta, M., Mulliez, E., Lepape, L., Eliasson, R., Gräslund, A., Fontecave, M., Reichard, P. i Sjöberg, B-M. (1996). The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* is at glycine 681. *J. Biol. Chem.* 271, 6827-6831
- Sze, I.S., McFarlan, S.C., Spormann, A., Hogenkamp, H.P. i Follmann, H. (1992). A possible new class of ribonucleotide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1101-1107
- Tamarit, J., Mulliez, E., Meier, C., Trautwein, A. i Fontecave, M. (1999). The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The small protein is an activating enzyme containing a [4Fe-4S](2+) center. *J. Biol. Chem.* 274, 31291-31296
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F.R. i Conway, T. (1999). Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J. Bacteriol.* 181, 6425-6440
- Tauer, A. i Benner, S.A. (1997). The B12-dependent ribonucleotide reductase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophila*: An evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 53-58
- Thelander, L. (1974). Reaction mechanism of ribonucleoside diphosphate reductase from *Escherichia coli*. Oxidation-reduction-active disulfides in the B1 subunit. *J. Biol. Chem.* 249, 4858-4862
- Thelander, L., Eriksson, S. i Åkerman, M. (1980). Ribonucleotide reductase from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 255, 7426-7432
- Thelander, L. i Gräslund, A. (1994). Ribonucleotide reductase in mammalian systems. In *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, Inc. 109-129
- Tunggle, C.K. i Fuchs, J.A. (1986). Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *EMBO J.* 5, 1077-1085
- Uhlin, U. i Eklund, H. (1994). Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature.* 370, 533-539
- Vassinova, N. Kozyrev, D. (2000). A method for direct cloning of Fur-regulated genes: identification of seven new Fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 146, 3171-3182

- von Döbeln, U. i Reichard, P. (1976). Binding of substrates to *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 251, 3616-3622.
- Wagner, A.F.V., Frey, M., Neugebauer, F.A., Schäfer, W. i Knappe, J. (1992). The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine 734. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 996-1000
- Wang, P.J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X.C., Thelander, L. Huffaker, T.C. (1997). Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6114-6121
- Willing, A., Follmann, H. i Auling, G. (1988). Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme. *Eur. J. Biochem.* 170, 603-611
- Woese, C.R., Kandler, O. I Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 4576-4579
- Yang, F.D., Lu, G.Z. i Rubin, H. (1994). Isolation of ribonucleotide reductase from *Mycobacterium tuberculosis* and cloning, expression, and purification of the large subunit. *J. Bacteriol.* 176, 6738-6743
- Young, P., Öhman, M., Xu, M.Q., Shub, D.A. i Sjöberg, B.M. (1994a). Intron-containing T4 bacteriophage gene sunY encodes an anaerobic ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 269, 20229-20232
- Young, P., Öhman, M. i Sjöberg, B.M. (1994b). Bacteriophage T4 gene 55.9 encodes an activity required for anaerobic ribonucleotide reduction. *J. Biol. Chem.* 269, 27815-2

6. ARTICLES I-IX

6.1. Article I

6.2. Article II

6.3. Article III

6.4. Article IV

6.5. Article V

6.6. Article VI

6.7. Article VII

6.8. Article VIII

Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme.

Eduard Torrents¹, Patrick Aloy³, Isidre Gibert¹ and Francisco Rodríguez-Trelles^{2*}

¹Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and Departament de Genètica i de Microbiologia, Bacterial Molecular Genetics group, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain. ²Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida de Vigo s/n., Apartado 122, 15780-Santiago de Compostela, Spain. ³EMBL, Meyerhofstrasse, 1, D-69117 Heidelberg, Germany.

Key words: nrd, Ribonucleotide Reductases, molecular evolution, duplication, lateral transfer, phylogeny.

Abbreviations: RNR, ribonucleotide reductase; RMSD, Root Mean Square Deviation; PFL, Pyruvate formate lyase

INTRODUCTION

Ribonucleotide reductases (RNRs) are a family of structurally complex enzymes that play an essential role in all living organisms: they catalyze all *de novo* synthesis of deoxyribonucleotides required for DNA replication and repair. The three known classes of RNRs use free radical-chemistry for catalysis, but differ in their behavior towards oxygen (Sjöberg 1997). Class I RNRs require oxygen to produce a tyrosyl radical by a di-ferric iron center. They consist of two homodimeric proteins, NrdA ($\alpha 2$) and NrdB ($\beta 2$) arranged as a heterotetramer ($\alpha 2\beta 2$); the tyrosyl radical is located in the NrdB

polypeptide. Based on sequence identity and allosteric properties class I RNRs are subdivided into classes Ia and Ib, encoded respectively by the *nrdABs* and the *nrdEFs* genes. Class II RNRs use adenosylcobalamin (AdoCob) as radical generator in a process which is not affected by oxygen. They are mostly 2 homodimers encoded by the *nrdJ* genes. Class III RNRs use S-adenosylmethionine (AdoMet) and a small activating protein, NrdG, to generate a stable glycy radical; structurally they are ($2\beta 2$), with subunits encoded by the *nrdDG* genes. Recent studies have established a connection between class III RNR and the pyruvate formate lyase (PFL) system: as in the PFL

system, the NrdG protein of class III RNR acts as an activase in the generation of the glycy radical of NrdD (Tamarit et al. 1999; Torrents, 2001). The NrdG-activase harbours one [4Fe-4S] cluster per polypeptide chain. The glycy radical, located at the C-terminal end of NrdD is sensitive to oxygen.

RNRs are allosterically regulated enzymes, capable of reducing all the four common ribonucleotides. The binding site for substrates and allosteric effectors is located on the large α -polypeptide. The substrate specificity of the catalytic site for a given ribonucleotide is determined by binding specific deoxyribonucleoside triphosphates (dATP, dTTP, dGTP) or ATP to an allosteric site termed specificity site. Classes Ia and III, and some class II RNRs contain an extra allosteric site (referred to as activity site) which activates or inhibits the overall activity of the enzyme, with ATP and dATP acting as enhancer and inhibitor, respectively (reviewed in Jordan and Reichard 1998; Stubbe 1998). RNRs are sophisticated enzymes, functionally dependent on complex metabolites, which may seem to indicate a recent evolutionary origin of these proteins. That the ribonucleotide reduction pathway in which they are involved occurs in all modern organisms studied to date, and that the different RNR classes exhibit very similar tertiary structures and catalytic mechanisms (Reichard 1997; Stubbe et al. 2001) suggests that they originated from a single ancestral form, prior to the divergence of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. Indeed, as they are essential for the production of the building blocks for DNA synthesis (Reichard 1997; Freeland *et al.*, 1999) RNRs are hypothesized to be involved in the transition from the RNA to the DNA world, postulated to have

occurred via a methyl-RNA intermediate (Poole *et al.*, 2000). In addition, recent studies suggest that the *cenancestor* (*i.e.*, the most recent common ancestor to all extant life forms) must have been quite complex metabolically, more similar to contemporary forms than thought previously (Castresana and Moreira 1999; Kyrpides et al. 1999). If the RNRs had originated from each other by duplication of the cenancestor, it would follow that classes II and III RNRs (and also Ib) were lost in Eukarya, because they are not present in this life domain (see Gleason 1970; Stutzenberger 1974). Yet, despite the metabolic prominence of RNRs, this and other fundamental questions, such as which is the ancestral class from which all RNR derive, and what is the contribution of lateral transfer for their contemporary phylogenetic distribution have not been addressed so far. Moreover, RNRs have been largely neglected in efforts to determine the functional content of the last universal common ancestor (Kyrpides *et al.* 1999). To a great extent, this gap in our understanding of the evolutionary history of RNRs is attributable to that they constitute a highly diverged protein family, which makes the alignment of the primary sequences complicated. In turn, structural information becomes invaluable for identifying key active residues (Russell, 1998a; Aloy *et al.*, 2001a), binding sites and surfaces (Russell *et al.*, 1998b) which can guide primary sequence alignment, ultimately making possible more detailed evolutionary analyses. The present study aims to fill this gap using a reliable alignment based on available structural information on RNRs.

MATERIALS AND METHODS

Sequence Retrieval and Alignment. Amino acid sequences of *ribonucleotide reductases* were retrieved from the GeneBank, EMBL, and PIR databases (Release 65, December, 2000) with the BLAST (*vs.* 2.1) sequence similarity search tool. Blast probing of DNA and protein databases was performed with the Blastp and tBlastn programs (Altschul *et al.*, 1997). Accession numbers for the sequences are given in Table 1.

For alignment of the amino acid primary sequences we adopted the following strategy: first we aligned the sequences using the ClustalX *vs.* 1.81 (Thompson *et al.* 1997) program with the default gap opening and extension penalties. We then adjusted the alignments by eye, with the aid of the GeneDoc *vs.* 2.6.001 (Nicholas and Nicholas 1997). Visual fine-tuning of the alignment was conducted taking into account: i) data on known three-dimensional structural properties of the proteins (Logan *et al.*, 1999; Uhlin and Ekund 1994); ii) identified conserved putative allosteric binding regions (Eriksson *et al.*, 1997); and iii) the alignment of the RNR family hosted in the Pfam protein database (which also incorporates 3D-structural data; Bateman *et al.*, 2000). First, sequences pertaining to each RNR class were aligned separately. The resulting three multiple alignments were then aligned to each other. After removal of all gaps and ambiguities the length of the alignment was 248 residues.

Crystallographic structures of the pyruvate formate-lyase (2pfl), NrdA subunit of ribonucleotide reductase class Ia (1rlr), and NrdD subunit of anaerobic ribonucleotide reductase class III (1b8b) were obtained from the Brookhaven Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000 - <http://www.rcsb.org/pdb/>) and converted to protein sequence using the

STAMP package (Russell and Barton, 1992 - <http://barton.ebi.ac.uk/manuals/stamp.html>).

The domain definition and evolutionary families adopted for the analysis of the protein sequences were those of the *Structural Classification of Proteins* (SCOP release 1.53) database (Murzin *et al.*, 1995; <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/>) and the *Protein Families Database of Alignments and HMMs* (Pfam release 6) database (Bateman *et al.*, 2000; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>).

Structural alignments and P_{3d} -value calculation.

Alignment of the 3D-structures was performed with the STAMP package for protein structure alignment and superimposition. All the alignments were double-checked, and manually edited when required. Superposition and calculation of the structurally equivalent regions across the three proteins were also conducted with the STAMP package.

Once the structural alignment is attained, there is still to measure the corresponding sequence identity and the probability of this identity occurring by chance. For this goal Murzin (1993) derived a P_{3d} -value based on the tendency of buried residues to be hydrophobic and exposed residues to be hydrophilic. It was originally applied to the cystatin-monelin similarity, where an evolutionary relationship was inferred based on a P_{3d} -value of approximately 10^{-3} . More recently, Aloy *et al.* (2001) applied it to the search for possible links between sequence and structure spaces.

Phylogenetic analyses. We adopted a model-based maximum likelihood approach of phylogenetic inference (e.g., Yang *et al.* 1995; Huelsenbeck and Crandall 1997; Rodríguez-Trelles *et al.*, 1999; 2000). We first built a

protein distance matrix using a simple Poisson model, and used this matrix to recover a tree with the Neighbor-Joining algorithm. The tree topology so obtained was then used as an hypothesis for model fitting using the likelihood ratio test. Amino acid substitution models used in this study are all special cases of the model of Yang *et al.* (1998); this model is based on the matrix of Jones *et al.* (1992) with amino acid frequencies set as free parameters (referred to as JTT-F). Variation of substitution rates across sites is accommodated into the substitution models using the discrete-gamma approximation of Yang (1996a) with shape parameter α (setting 8 equally probable categories of rates to approximate the continuous gamma distribution; referred to as dG models). The value of α is inversely related to the extent of rate variation among sites (Yang 1996a). The transition probability matrixes of models, and details on parameter estimation are given in Yang (2000).

Likelihood ratio tests are applied for contrasting several hypotheses of interest. For a given tree topology (i.e. Fig. 1), a model (H_1) containing p free parameters and with log-likelihood L_1 fits significantly better the data than a nested sub-model (H_0) with $q = p - n$ restrictions and likelihood L_0 if the deviance $D = -2 \log \frac{L_1}{L_0} = -2(\log L_1 - \log L_0)$ falls in the rejection region of a χ^2 distribution with n degrees of freedom (Yang 1996b). We use several starting values in the iterations to guard against the possible existence of multiple local optima. These analyses are conducted with the program DAMBE (Xia 2000), and the

CODEML program from the PAML *vs* 3.0b package (Yang 2000).

The model found to describe satisfactorily the amino acid replacement process in the RNR gene region is used as a hypothesis for phylogenetic reconstruction by distance methods. The estimate of α that we use in distance computation is that obtained simultaneously by the joint likelihood comparison of all sequences in the first stage, which can be considered the most reliable (Yang 1996a). Statistical support for nodes of the NJ trees is assessed using 50% majority-rule consensus trees compiled from 1000 bootstrap replications (Felsenstein 1985).

RESULTS

Distribution of the rnr classes Across the Tree of Life. Table 1 compiles available information on the distribution of the RNR classes across the archaea, eubacteria, and eukarya life domains, as defined by Woese (1987). Data about presence/absence of RNR classes is continuously growing with genome sequencing projects. Three main conclusions are: i) all three RNR classes are represented in archaeobacteria and eubacteria. All archaeobacteria exhibit RNR classes II and III, except for the cases of *Archaeoglobus* and *Thermoplasma*, which contain only class II, and *Methanococcus* which carries only class III; in contrast, class I RNR is represented only in one single archaeobacterial species, *Halobacterium* sp., which also bears class II. (see Table 1).

Table I. Occurrence of Ribonucleotide Reductases in the species of this study

Species	Methabolism	Sequence Status	RNR Classes		Accession numbers
EUKARYOTA					
Metazoa					
<i>Homo sapiens</i>	AE	G	Ia		P23921
<i>Mus musculus</i>	AE	g	Ia		P07742
<i>Danio rerio</i>	AE	S	Ia		U57964
<i>Caenorhabditis elegans</i>	AE	G	Ia		Q03604
Viridiplantae					
<i>Nicotiana tabacum</i>	AE	g	Ia		Y10862
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AE	g	Ia		T51813
Fungi					
<i>Neurospora crassa</i>	AE	g	Ia		AF171697
<i>Candida albicans</i>	AE	g	Ia		AJ390500
<i>Cryptosporidium parvum</i>	AE	g	Ia		AF043243
<i>Sacharomices cerevisiae</i>	AE	G	Ia(2x)		P21524, P21672
<i>Schizosaccharomices pompe</i>	AE	g	Ia		P36602
Alveolata					
<i>Plasmodium falciparum</i>	AE	g	Ia		AF205580
Eukaryota viruses					
<i>Bovine herpes virus</i>	AE	S	Ia		P50646
<i>Pseudorabies virus</i>	AE	S	Ia		P50643
<i>Varicella Zoster</i>	AE	S	Ia		P09248
<i>Herpes virus</i>	AE	S	Ia		P08543
<i>Vaccinia virus</i>	AE	S	Ia		P20503
<i>Varicela virus</i>	AE	S	Ia		P32984
<i>Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus</i>	AE	S	Ia		NC_002169.1
<i>African swine fever virus</i>	AE	S	Ia		NP_042739
<i>Herpes virus A</i>	AE	S	Ia		Q01037
<i>Epstein Barr virus</i>	AE	S	Ia		P03190
<i>Orgya pseudotsugata virus</i>	AE	S	Ia		U75930
ARCHAEBACTERIA					
Euryarchaeota					
<i>Methanococcus jannaschii</i>	AN	G		III	U67527
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	AN	G		II III	AE000666
<i>Halobacterium sp.</i>	AE	G	Ia	II	AE005120, AE005073
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AN	G		II	AE000782
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	AE	G		II	U73619
<i>Pyrococcus furiosus</i>	AN	g		II III	U78098, TIGR UG
<i>Pyrococcus horiskoshii</i>	AN	G		II III	H71143, AP000001
<i>Pyrococcus abyssi</i>	AN	G		II III	AJ248288, AJ248283
<i>Aeropyrum pernix</i>	AE	G		II	AP000063
EUBACTERIA					
Aquificales					
<i>Aquifex aeolicus</i>	AN/MI	G	Ia		AE000657
Thermotogales					
<i>Thermotoga maritima</i>	AN	G		II	Y12877
Thermus/Deinococcus group					
<i>Deinococcus radiodurans</i>	AE	G	Ib	II	AE001826, D75281
Green non-sulfur bacteria					
<i>Chloroflexus</i>	AN			II	Person. Commun.
Cyanobacteria					
<i>Synechocystis sp.</i>	AE	G	Ia	II	P74240
Low G+C gram-positive bacteria					
<i>Lactococcus lactis</i>	FA	S	Ib	III	AE005176

<i>Streptococcus pyogenes</i>	FA	G	Ib(2x)		III	TIGR UG
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FA	g	Ib		III	TIGR UG
<i>Streptococcus mutans</i>	FA	g	Ib		III	TIGR UG
<i>Staphylococcus aureus</i>	FA	G	Ib		III	AJ133495,AP003365
<i>Enterococcus faecalis</i>	FA	g	Ib		III	TIGR UG
<i>Mycoplasma genitalium</i>	AE	G	Ib			P47473
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AE	G	Ib			U00089
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	AE	g	Ib			TIGR UG
<i>Bacillus stearothermophilus</i>		g	Ia	II		TIGR UG
<i>Bacillus halodurans</i>	AE	g	Ia	II		BAB04220.1, BAB06529.1
<i>Bacillus anthracis</i>		g	Ib		III	
<i>Bacillus subtilis</i>	AE	G	Ib(2x)			P50620,Z68500
<i>Bacillus megaterium</i>	AE			II		Person. Commun.
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	FA	S		II		L20047
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AN	g	Ia	II	III	TIGR UG
<i>Clostridium difficile</i>	AN	g	Ia	II	III	TIGR UG
High G+C gram-positive bacteria						
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	AE	G	Ib(2F)	II		P50640, A70933
<i>Mycobacterium bovis</i>	AE	g	Ib	II		TIGR UG
<i>Mycobacterium leprae</i>	AE	g	Ib	II		AL583923
<i>Mycobacterium avium</i>	AE	g	Ib	II		
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	AE	S	Ib			Y09572
<i>Corynebacterium nephridii</i>	AE	S		II		Person. Commun.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	AE	g	Ib(2E)			TIGR UG
<i>Streptomyces coelicolor</i>	AE	g		II		T35125
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	AE	S		II		AJ224870
Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides group						
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		g		II	III	TIGR UG
Green sulfur bacteria						
<i>Chlorobium tepidum</i>	AN	g		II		TIGR UG
Spirochaetes						
<i>Treponema pallidum</i>	AE	G	Ia			B71255
<i>Borrelia burgorferi</i>	AE	G	Ia			TIGR UG
Plantomyces/Chlamydia group						
<i>Chlamydia trachomatis</i>	AE	G	Ia			D71466
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	AE	G	Ia			TIGR UG
Proteobacteria						
Delta & Epsilon subdivision						
<i>Helicobacter pylori</i>	AE	G	Ia			P55982
<i>Campylobacter jejuni</i>	AE	G	Ia			AL139074
<i>Rickettsia prowasekii</i>	AE	G	Ia			C71655
<i>Geobacter sulfurreducens</i>		g		II		TIGR UG
Alfa subdivisio						
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	FA	g		II	III	Genome project
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	FA	g		II		
<i>Mesorhizobium loti</i>	AE	g		II		NC002678
<i>Caulobacter crescentus</i>		g	Ia			TIGR UG
Beta subdivision						
<i>Neisseria meningitidis</i>	AE	G	Ia			AL162756
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	AE	g	Ia			B81101
<i>Ralstonia eutropha</i>	AE	S			III	AJ012479
Gamma subdivision						
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	AE	g	Ia		III	TIGR UG
<i>Actinobacillus</i>						
<i>actinomycetemcomitans</i>	FA	g	Ia		III	TIGR UG
<i>Pasteurella multocida</i>	FA	g	Ia		III	TIGR UG
<i>Haemophilus influenzae</i>	FA	G	Ia		III	P43754, A64047
<i>Vibrio cholerae</i>	FA	G	Ia		III	TIGR UG
<i>Buchnera sp.</i>		G	Ia			AP00118
<i>E. coli, Enterobacteriaceae</i>	FA	G	Ia Ib		III	X06999, P39452, P28903

<i>Salmonella typhimurium</i>	FA	g	IaIb		III	X72948,X73226,AF242390
<i>Yersinia pestis</i>	FA	g	IaIb		III	TIGR UG
<i>Shewanella putrescasciens</i>	FA	g			III	TIGR UG
<i>Xylella fastidiosa</i>		G	Ia			C82710
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FA/AE	G	Ia	II	III	AE004545,AE004962,AE004618
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	FA/AE		Ia	II	III	
Eubacterya viruses						
<i>Roseophage S101</i>				II		NC002519
<i>Mycobacteriophage L5</i>		G		II		S30995
<i>Phage T4</i>		G	Ia		III	AF158101, AF158101
Notes:	G/g S TIGR UG	genome sequence available (complete/partial) gene sequence known TIGR Unfinished Genomes				

Eubacteria exhibit the greatest diversity of RNR classes within one single species. In this life domain the three RNR classes occur simultaneously in the genomes of *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium acetobutylicum*, and *Clostridium difficile*; in the remaining species it is possible to observe every conceivable pair-wise combination of RNR classes (I/II, I/III, and II/III). In Gram-positive eubacteria, the majority of low-G+C content species exhibit class Ib-III combination; high-G+C content species, however, show almost exclusively class II, sometimes in conjunction with class Ib. In Gram-negative eubacteria the Proteobacteria group exhibits the most diverse spectrum of RNR class combinations: for example, *E. coli* exhibits the two types of class I RNR (i.e., Ia and Ib), and class III (see Table 1). ii) known *nrd* sequences from eukaryotes all pertain to the oxygen-dependent class Ia. Class II (i.e., dependent on AdoCob) activity has however been detected in crude extracts of the algae *Euglena gracilis*, and the primitive fungus *Phythomyces chartarum* (Gleason 1970; Stutzenberger 1974). Albeit the corresponding sequences for the *nrd* genes of these organisms have not been obtained yet, reported activities represent the first evidence pointing to that eukaryotes can bear RNR classes other than Ia; and iii) viruses have similar RNR classes to

their hosts. Remarkably, however, viral sequences show distinctive features in regions of the amino acid chain involved in the activity site of the enzyme (Nikas et al., 1986; Berglund 1972).

Broadly speaking, the distribution of the RNR classes fits what is expected from the environment inhabited by the host genome regarding to the presence/absence of oxygen: aerobes have RNR class I (which requires oxygen for functioning; e.g., the eubacteria *Treponema pallidum*, and all eukaryotes carrying RNR class Ia), II (which is oxygen-independent; e.g., the archaeobacteria *Aeropyrum pernix*), or both (e.g., the eubacteria *Mycobacterium tuberculosis* and the archaeobacteria *Halobacterium sp.*); and anaerobes have RNR class III (which is inactivated by oxygen; e.g., the archaeobacteria *Methanococcus jannaschii*), II (e.g., the archaeobacteria *Thermotoga maritima*), or both (e.g., the eubacteria *Porphyromonas gingivalis* and the archaeobacteria *Methanobacterium thermoautotrophicum*). Beyond the constrains imposed by oxygen, however, there is not an obvious rule to anticipate specifically which RNR class (es) (RNR I, II, or both, in aerobes; or RNR II, III, or both, in anaerobes) is (are) to be present in a given bacterium. Such absence of a pattern might be best illustrated by the genera *Corynebacterium* and *Bacillus*,

these two genera each consist of a group of closely related species which, however, differ in their RNR class (es). Additional examples are the α -proteobacterium *P. aeruginosa*, seemingly a strict aerobe carrying RNR III (together with classes I and II), and the Gram-positive-low-G+C *C. acetobutylicum*, which bears RNR I (together with classes II and III) in spite that is a strict anaerobic.

Primary Sequence Alignment and Comparison of Three-Dimensional Structures indicate that RNR classes are distantly related homologous. In principle, homology of structure is better conserved than sequence (Patthy 1999), thereby remote homology of the RNR classes might be expected to be better reflected by comparison of their three-dimensional structures. In turn, structural information provides guidance for the alignment of the primary sequences from the localization of residues critical for binding the allosteric effectors, as well as other residues of the active site. 3D structures have been determined for two out of the three different RNR, and are available at the Protein Data Bank: the NrdA subunit of ribonucleotide reductase class Ia (Uhlen and Eklund 1994), and NrdD subunit of anaerobic ribonucleotide triphosphate reductase class III (Logan et al. 1999). In addition, the crystal structure of the pyruvate formate-lyase (Becker et al. 1999) has been solved; this glycil radical enzyme exhibits the same glycil radical chemistry than the Class III RNR as well as most structural features, thereby it is considered herein. For class II structure is not accessible, but a personal communication structure has been reported to exhibit the same fold (Stubbe et al. 2001).

The two representatives of the RNRs Class I and III, and pfl have the same structure. They

form a scaffold known as PFL-like glycil radical, which consists of a 10-stranded β -barrel that accommodates a hairpin loop inside. Figure 1 and Table 2 show, respectively the structure and RMSD values that result after superposition of the three structures. The degree of structural equivalence is highest in the hydrophobic core (corresponding to the active center of the enzymes), and differences are confined to the external loops. The structural alignment between 1b8b and 2pfl reveals a significant degree of similarity (P_{3d} -value $< 10^{-3}$), hardly detectable by mere comparison of the primary sequences (see below). Apparently, these two proteins shared a common ancestor. The situation is different when these two structures are aligned to 1rlr. Here, despite that the level of sequence similarity after structural alignment is insignificant (P_{3d} -value $> 10^{-3}$), the residues that have been described to be functionally important align nicely, always occupying equivalent regions. This kind of pattern has proven to be enough for assigning two proteins to the same superfamily in cases like ours, where other functional features are also consistent. To ascertain whether they have already been assigned to a functional family we run the three protein sequences against the Pfam (Bateman et al. 2000) database.

The NrdA subunit matched the *Ribonucleotide Reductases* Pfam family; Class III anaerobic ribonucleotide triphosphate reductase and pyruvate formate-lyase matched the *Glycil Radical* Pfam family along their last 150 C-term residues, reinforcing that they share a common ancestor..

Table 2. Protein length and RMSDs

	1b8b	2pfl	1lr
1b8b	589 res		
2pfl	3.1 Å / 451 res	759 res	
1lr	3.6 Å / 331 res	3.7 Å / 345 res	748 res

The number of residues for each protein are shown in the table diagonal. Underneath the diagonal are shown the RMSDs and the length of the structurally equivalent regions. 1lr *E. coli* NrdA X-ray structure, 1b8b T4 phage T4 X-ray structure and 2pfl *E. coli* pyruvate formate lyase X-ray structure.

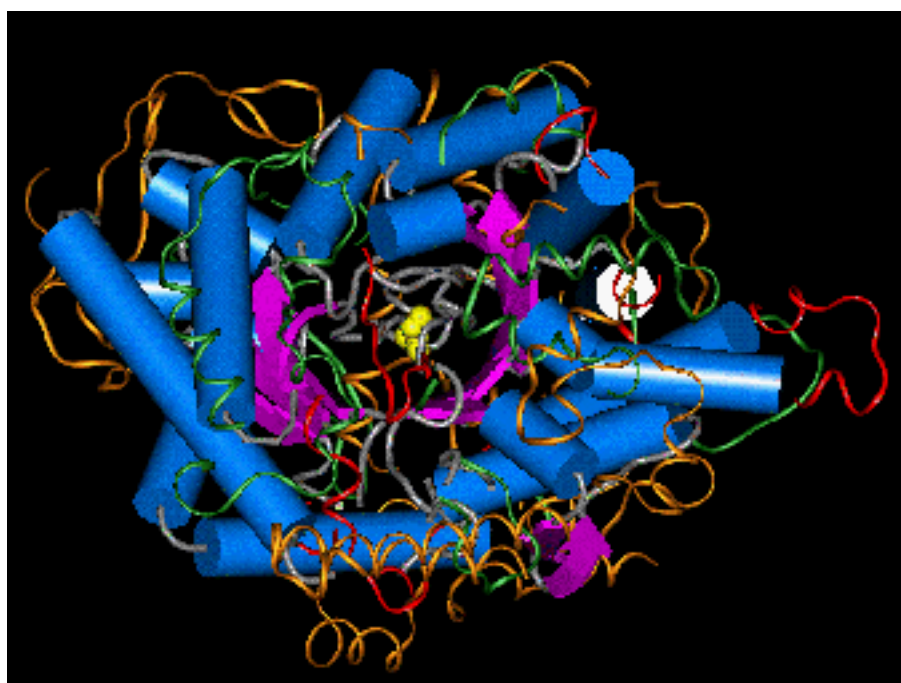


Figure 1.- Structural superposition of the 1b8b, 1lr and 2pfl domains. The structurally equivalent regions are shown in helix'n'strand representation and colored according to its secondary structure (-helices in blue; -strands in magenta and non structured regions in grey). The different segments are shown in ribbon representation and colored after the different protein families: R1 subunit of ribonucleotide reductase (1lr) in green; Class III anaerobic ribonucleotide triphosphate reductase (1b8b) in red and pyruvate formate-lyase (2pfl) in gold. The catalytic cysteines are represented as a yellow balls.

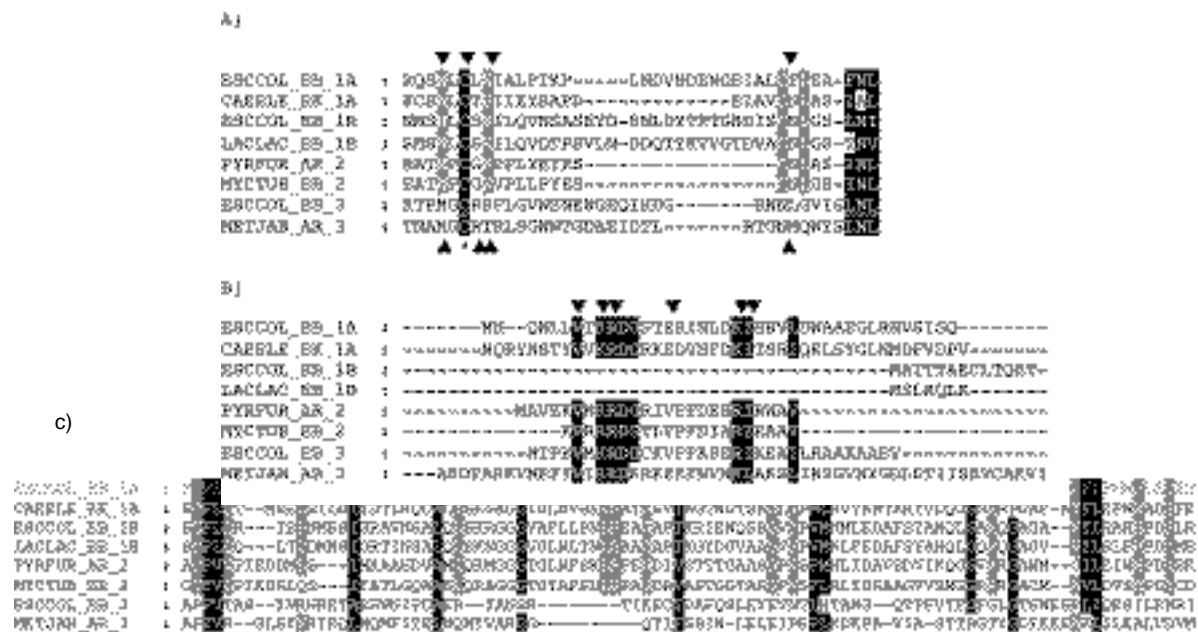


Figure 2. Alignment of eight representatives of the classes I, II and III RNR for the regions involved in binding the effectors at the A) active site, B) activity site and C) specificity site. Amino acid similarity groups are as follows: the hydrophobic residues L, I, A, V, M, F and W; R and K; D and E. Black and grey shades denote sites showing 87% and 75% of the residues similar, respectively. Downward arrowheads (▼) indicate residues involved in effector and substrate binding (allosteric and active site) in the 3D structure of the class Ia of *E. coli*. Upward arrowheads (▲) in A indicate residues corresponding to the active site in the 3D structure of class III phage T4. The asterisk (*) indicates the cysteine responsible for initiating the reduction in all the three RNR classes.

Similar to the case of many other remote homologues (see Holm and Sander 1994), comparison of the aligned primary amino acid sequences between the three RNR classes reflects low pair-wise overall similarity. Average within-class similarity values are 38%, 35%, and 36%, for RNR class I, II, and III, respectively; interclass average global similarity is largest between classes I and II (25%), and substantially lower (10%) between RNR classes I-III, or II-III. Conservation of primary sequence concentrates along short stretches encompassing the two types of allosteric binding sites (i.e. specificity and activity sites) and the active site, which are critical for maintaining the fold and function of the enzymes.

In all non-viral ribonucleotide reductases investigated so far specificity towards the substrate is achieved basically in the same fashion (Reichard, 1997). Therefore, it is not surprising that the binding residues for the allosteric effector in the specificity site (see Fig 2a) are almost identical for RNR classes I and II. In class III this region also exhibits an increased proportion of conserved residues (specially aliphatic amino acids; see Fig. 2a); they do not match those given above that have been inferred from the X-ray structure of class Ia (Eriksson, 1997); however, that they have remained basically unchanged during evolution indicates that they probably are the residues controlling substrate specificity in NrdD as well.

Table II.- Results of the likelihood ratio test carried out on the RNR amino acid sequences used in this study

H ₀ : H ₁	RNR class					
	I (55,419)	Ia (43,433)	Ib (12,676)	II (22,412)	III (21,473)	all combined (98,248)
Poisson : Poisson+ dG = 1	1,354.1	1,092.2	4741	6731	3189	1,143.6
(from Poisson+ dG)	1.97	1.85	1.26	1.75	2.31	2.87
Poisson+ dG : JTT-F + dG = 19	529.8	4,213.8	221.0	190.5	1,912.7	249.8
(from JTT-F + dG)	1.53	1.50	1.01	1.13	1.73	2.25

Note.- In each row, the null hypothesis (H₀) is compared with a hypothesis (H₁). Log-likelihood values are obtained assuming the NJ topology based on the Poisson distance using the complete RNR sequence data set. All values of the likelihood ratio test statistic (-2log) are significant (< 10⁻⁶). In parentheses are given the number of sequences and the length of the alignment for each RNR class; are degrees of freedom; Poisson+ dG and JTT-F + dG are the Poisson and the Yang (1993) (see the materials and methods section) models assuming discrete gamma rates at site

Figure 2 b shows the alignment of the N-terminal region for the three RNR classes. There is a conserved motif (V-x-KRDG-x₍₉₎-KI-x₍₃₎-I) which embodies the residues involved in binding the nucleotides at the overall activity site. From the alignment, and data on enzymatic properties of the RNR there are two different situations: on the one hand, the RNR classes Ia, III, and some class II proteins, which exhibit the conserved motif of the activity site, and are inhibited by dATP; on the other hand, the RNR classes Ib and the remaining class II proteins, which lack the first 50 residues of the N-terminal end of the protein which host the activity site, and are not inhibited by dATP (Eliasson, 1999).

In the active site only one residue, the transient radical cystein (Cys439 in the *E. coli* class I, Cys408 in the *L. leichmannii* class II, and Cys290 in the T4-phage class III) is conserved across all the three RNR classes. This cystein is involved in substrate activation by hydrogen abstraction from C3' of the substrate. In addition, two extra cysteine residues also are highly conserved, at least across classes I and II: Cys225 in the *E. coli*

class I, which corresponds to Cys119 in the *L. leichmannii* class II, and Cys79 in T4-phage class III; and Cys462 in the *E. coli* class I, which matches with Cys419 in *L. leichmannii* class II, but becomes Asn311 in T4-phage class III. Although these two residues are not identical across the three classes, they occupy the same position in the 3D structures, and both are required for reduction of the first cysteine residue mentioned above. The area surrounding the transient radical cystein exhibits the highest degree of similarity in the alignment (see Fig 2c).

The rest of the alignment reflects the peculiarities of each RNR class. Classes I and II are more similar to each other than to class III in the C-terminal moiety; in this region the first two classes contain a stretch of cysteines that works putatively as an hydrogen acceptor for the reductive system (Stubbe and van der Donk, 1998); in addition, class II exhibits an extra domain with a conserved motif (D-x-H-x-G-x14-V-x-x-G-x35-S-x-V-x36-G; Tollinger, 1998), which binds S-adenosylcobalamin required to generate the

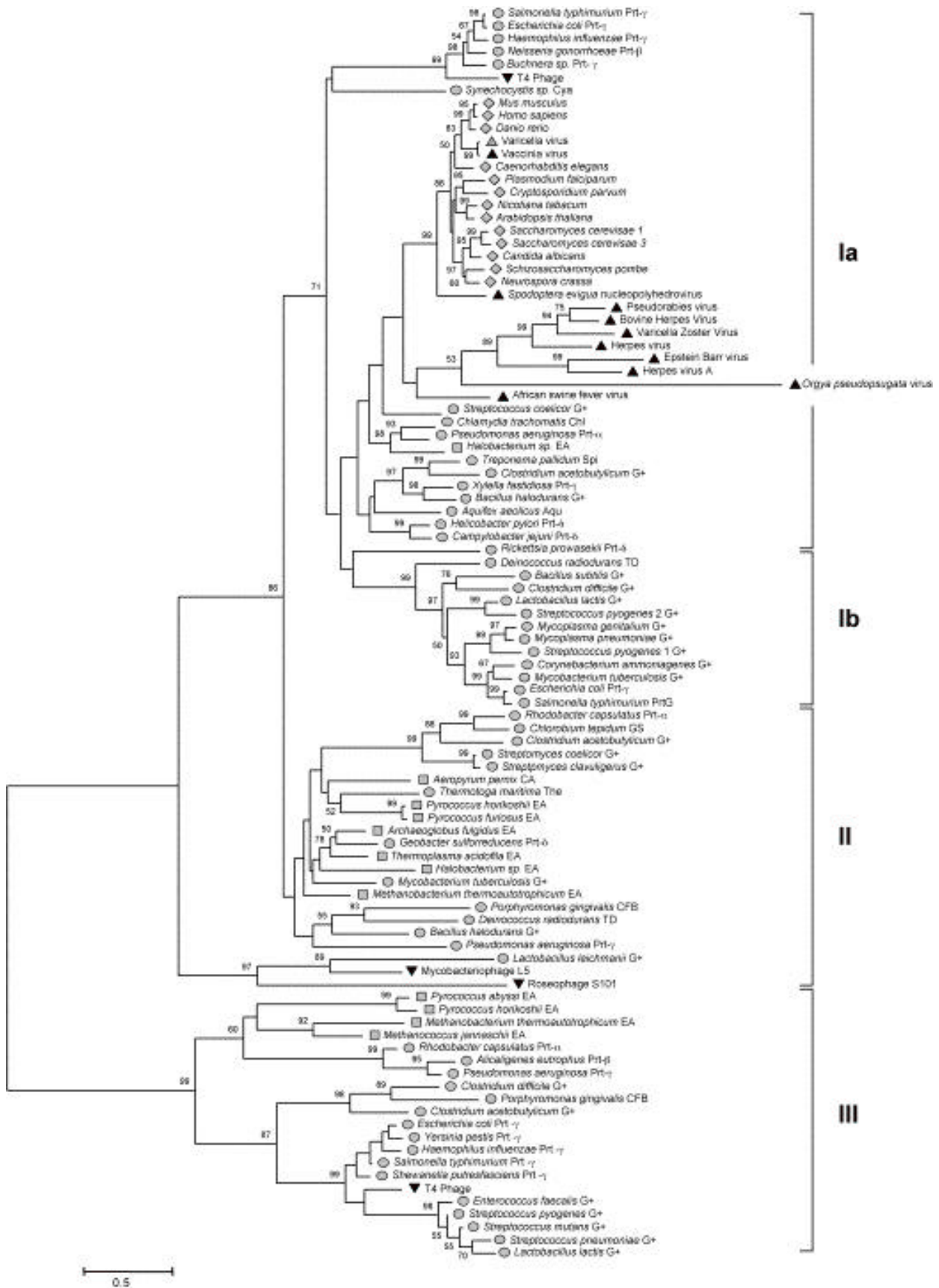


Figure 3.- Neighbor-Joining (NJ) tree based on the Poisson+dG ($\lambda = 2.25$; see Table 3) distance for the RNR amino acid data. Branch lengths are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. Percentage bootstrap values (based on 1000 pseudo replications) are given on the nodes for trees A-C.

radical. In class III, the domain containing the glycol radical is located nearby the active center in the crystal structure; specifically, the glycol radical occupies the same position than the tyrosine side chain of class I, which is involved in the radical transfer pathway.

Phylogenetic inferences. Table 3 shows the log-likelihood ratio statistic values for models. Log-likelihood values are derived assuming the topology obtained with the Neighbor-Joining algorithm based on the Poisson distances between pairs of amino acid sequences, separately from each RNR class (I, Ia, Ib, II, and III), and from all the three RNR classes pooled together. dG models (i.e., Poisson + dG and JTT-F+dG) are always better than their uniform counterparts (i.e., Poisson and JTT-F; not shown), meaning that variation among sites in the rate of amino acid substitution is a significant feature of the nrd data (see Table 3). Also, using an empirical matrix of substitution rates with the amino acid frequencies set as free parameters with the JTT-F+dG model of Yang et al. (1998), yields better likelihood scores than assuming an equal rate of change between any two amino acids with the Poisson+dG model (see Table 3). Table 3 also gives the estimates of the parameter α of the discrete gamma distribution obtained from each model. The Poisson+dG model produces systematically greater values of α than the JTT-F+dG model (i.e., 1.97 vs 1.53, 1.85 vs 1.50, 1.26 vs 1.01, 1.75 vs 1.13, 2.31 vs 1.73, 2.87 vs 2.25; for nrd I, Ia, Ib, II, and III, respectively; see Table 3),

underestimating the extent of the substitution rate variation from site to site. As inferred with the JTT-F+dG model, nrd classes Ib and III show the lowest (1.01) and the largest (1.73) values of α , respectively. When the sequences of all the three RNR classes are pooled together the value of α increases (2.25; Table 3), because of a reduction in the proportion of invariable sites in the alignment. It should be noted, however, that the α values for the RNR classes shown in Table 3 were obtained from different data sets, involving different species and numbers of sequences, so they can not be compared.

Figure 3 shows the unrooted neighbor-joining tree based on the Poisson+dG pairwise amino acid distances, using the ungapped alignment of all the RNR sequences of this study. The value of α used for distance calculation is that obtained by joint likelihood comparison of all sequences using the JTT-F+dG model (i.e., $\alpha=2.25$; see Table 3). The following general patterns are observed: i) the three RNR classes form three separate clusters, highly supported statistically (bootstrap values are 71 for RNR class I, and 99 for RNR class III, i.e., above the 70% Hillis and Bull's 1993 criterion); under the assumption of common ancestry, this observation would mean that the three RNR classes evolve independently from each other since before the diversification of the tree of life. Within RNR class I, class Ib forms a cluster clearly differentiated from class Ia (class Ib splits from within class Ia, but this branching is insignificant); class Ia groups eukaryotes apart from eubacteria, and divides the latest ones into two different clusters;

overall, species relationships are less defined from class Ia than from class Ib, pointing to that class Ia has diverged faster. ii) RNR classes I and II are more similar to each other than to class III. iii) sequences from eukaryote viruses form a cluster which split before the diversification of the RNR class Ia of their eukaryote hosts. In addition, RNR class II of *Lactobacillus leichmanii* forms a strongly supported clade with that of bacteriophages Mycobacteriophage L5 and Roseophage S101 (bootstrap value 97); apparently, this clade split before the diversification of the remaining RNR class II sequences. And iv), overall the phylogenetic relationships among the sequences reconstructed from each *nrd* class do not match the phylogeny of the species. Thus, for example although RNR class Ia groups eukaryotes (and eukaryote virus) together, is however unable to resolve the base of the eukaryote tree, and clusters different bacterial lineages intertwined with each other; particularly noticeable is the positioning of the archaea *Halobacterium*, which forms a strongly supported cluster with the eubacterial lineages of *P. aeruginosa* and *Chlamydia*. In addition, the phylogenetic trees yielded by each RNR class are not congruent with each other. Topological inconsistency between trees is not caused by differences in the set of outgroups used for the rooting of each RNR class (i.e., RNR classes I, II, and III are rooted using RNR classes II and III, I and III, and I and II, respectively), because the neighbor-joining trees obtained for each RNR class separately are basically identical to their counterparts in the global tree shown in Figure 3 (results not shown). Apparently,

the three RNRs evolve in a fashion beyond the limits imposed by the phylogenetic history of their hosting lineages.

DISCUSSION

RNR represent highly plastic proteins at the level of their primary sequence (similarity between classes ranges from 25% to 10%) yet, as we unveil herein, strikingly conserved structurally (see figure 1), in addition all maintaining the same protein radical chemistry. Our study favors that all modern RNR (classes I, II, and III) share a common ancestor that lived before the diversification of the tree of life; the different RNR arose from each other by duplication, followed by divergence with acquisition of new adaptations (i.e., regarding to their function and how it is affected by oxygen). Taking into account what is currently known about the function and distribution of RNRs across the tree of life, together with the results of the present study, next we will try to trace back some prominent episodes that configure the evolutionary history of this highly heterogeneous protein family.

Our first question concerns which RNR arose first. Figure 4 illustrates several hypotheses for the origin of the three RNR classes under the assumption that they arose by duplication from each other in the cenancestor, before the diversification of the tree of life. Figure 5 depicts the present-day relationships among RNR classes that are expected from nine different duplication scenarios (a trivial scenario, that the three classes derived from each other at the same time, i.e. star tree, is not depicted).

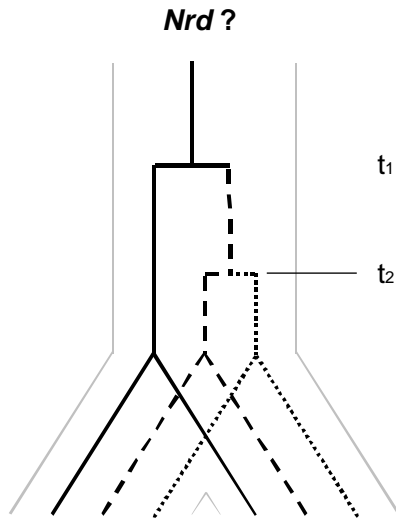


Figure 4.- Origin by duplication of the three known *nrd* gene classes under the assumption that they derive from a single unknown, primitive *nrd* gene (denoted by ?) in the cenancestor. t_1 and t_2 denote the time of the first and second duplications, respectively. Each line type corresponds to one *nrd* class. Branch lengths are not intended to have time or substitution rate meaning.

In order to discriminate among these hypothetical scenarios we need to know the direction of character evolution along the tree shown in Figure (4); yet, this tree is an unrooted tree (i.e., a network). Deciding the polarity of this network is complicated by the fact that there are not outgroups (i.e., external sequences that can be used as a reference) available, and because different RNR classes involve different sets of taxa, which can affect the location of the root by alternative methods such as the midpoint-rooting method. The positioning of the root by this technique would, however, be reliable if the different RNR classes were represented by the same species. Therefore we circumscribe this analysis to *C. acetobutylicum* and *P. aeruginosa*, the only species carrying RNR from the three classes; while this circumstance does not imply that the three RNR classes have been present in these two species since they split from their ancestor (see below), it seems a reasonable

assumption to start with. Figure 6 shows the neighbor-joining topology obtained for the *C. acetobutylicum* and *P. aeruginosa* RNR data subset using the poisson + dG model ($\lambda = 2.5$; obtained with the JTT + dG assuming the unrooted topology implied by Figure (5), with the position of the root inferred by the midpoint rooting method. This method assumes that the most divergent taxa in the phylogeny evolve at equal rates. To check this premise we tested the somewhat more restrictive assumption that the rate of evolution is the same for all taxa (i.e., the global clock assumption). The likelihood ratio test was performed using the JTT-F + dG model assuming the same topology as in Figure 5 (i.e., rooted along the branch 2-5). Relaxing the global clock assumption does not lead to a significant improvement of the likelihood score ($-2\log \lambda = 12.9$; 5 *d.f.*, $P > 0.01$). Moreover, placing the root along the branch 2-5 yields a likelihood score which is significantly better than the likelihood scores that result from positioning the root along the branches 2-3 or 2-4 ($-2\log \lambda = 123.2$; 5 *d.f.*, $P < 10^{-6}$ in both cases; by the REL test of Kishino et al. 1990), which reinforces the hypothesis that branch 2-5 is the true location of the root. Consequently, we can rule out scenarios b, c, e, f, g, and h in Figure (5), after which we are left with three alternative hypotheses for the origin of the RNR: a) assumes that RNR class I is the most primitive class, from which first originated RNR III, and subsequently RNR class II; d) assumes that RNR class II is the ancestral from which first originated RNR class III, and subsequently class I; and g) assumes that RNR class III is the ancestral from which originated either class I or class II, whichever had been gave place to the other. The relative likelihood of these

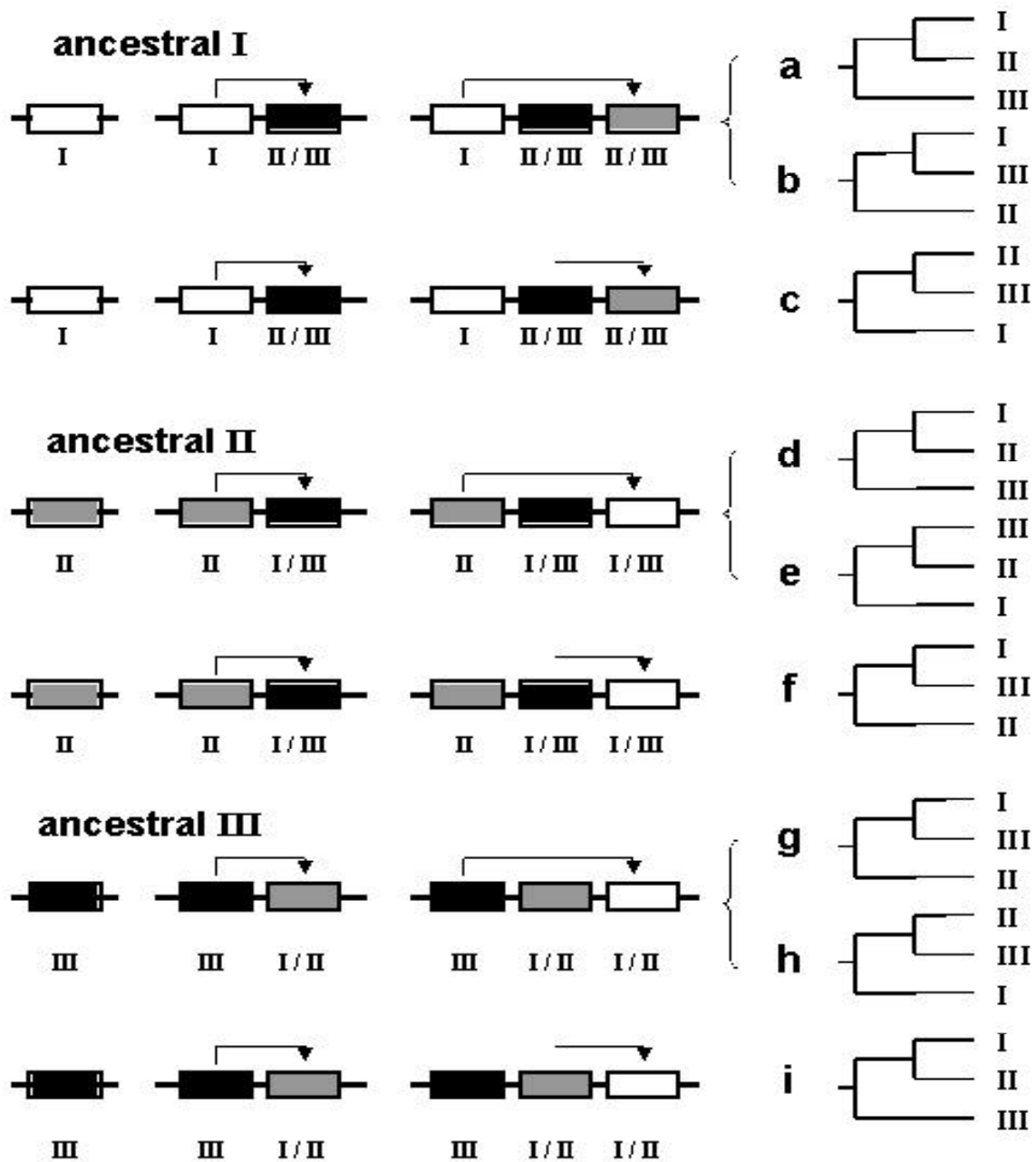


Figure 5.- 9 different hypothetical scenarios concerning the sequence of duplications (trivial scenario, that the tree classes derived from each other at the same time - , star phylogeny- is not presented).

three hypotheses will be discussed below in connection with available data on structural and functional properties of the enzymes, and

what is known about the conditions of the primitive earth.

Using the global clock tree shown in Figure 6 it is possible to obtain an estimate for the age

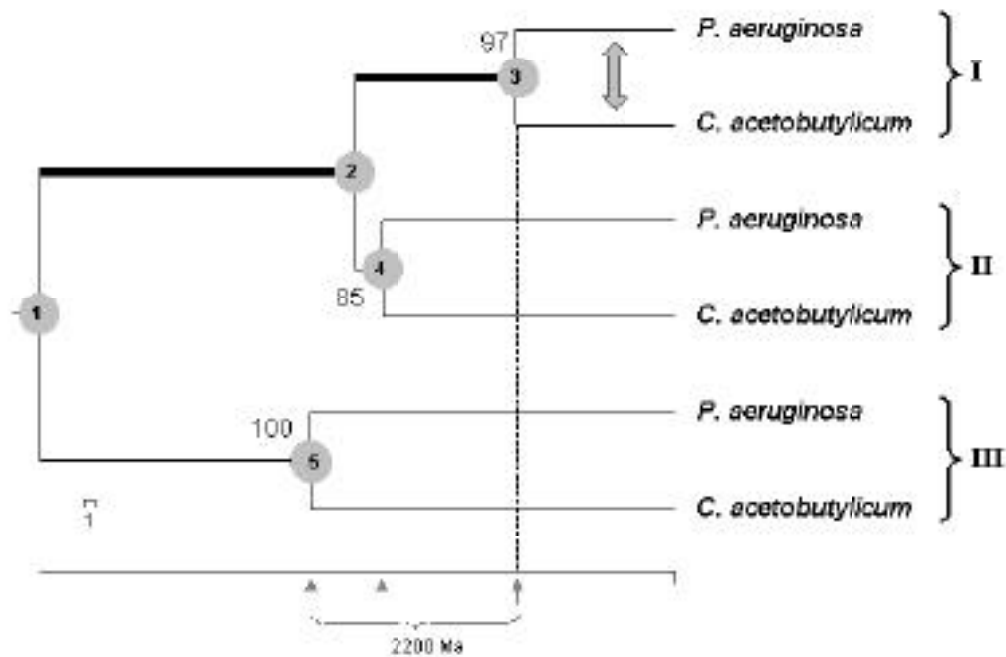


Figure 6.- The modular clock maximum likelihood tree of the relationships among the three classes and the two bacterial lineages. Internal node numbers are shown within grey boxes. Branch lengths are proportional to time.

of the duplications. As calibration point for the clock we set the time of the split between *Pseudomonas* and *Clostridium*, inferred from other sources to have been 2,200 My ago (Da-Fei et al. 1997; Doolittle et al. 1996). Indeed, because this split event has been recorded separately by each RNR class (nodes 3, 4, and 5 in figure 6), it is possible to obtain three different time estimates for each duplication. Accordingly, the times for the first and second duplications are 9,035.7 and 4,714.3, 5,060.0 and 2,200.0, and 3,892.3 and 2,031.8 MY ago, using nodes 3 (*i.e.*, class I), 4 (*i.e.*, class II), and 5 (*i.e.*, class III), respectively. Clearly, time estimates produced by RNR classes I and II are unrealistic, because they are older than the age of the earth (c.a. 4,500MY). Time estimates produced by class III RNR are more reasonable, although the inferred age of the second duplication is younger than the split of *Clostridium* and *Pseudomonas*. At any event

these estimates are rough, likely inflated (*e.g.*, influenced by greater mutation rates of the primitive life, owed to the lack of DNA repair mechanisms together with larger rates of ionizing radiation), with large standard errors (plus that of the calibration point), and are only intended to be illustrative. Accordingly, the first duplication is probably very old; and the time span elapsed between the first and second duplications was probably large, between 1500 and 2000My, with the second duplication occurring little before the diversification of the tree of life (or little after, as it will be discussed below).

Because nodes 3, 4, and 5 in Figure 6 are simultaneous in time, under constant evolutionary rate the branches leading from them to the terminal nodes should be of the same length. Yet, this is clearly not so (*e.g.*, the branch 2-3 is nearly three times larger than the branch 2-4; see Figure 6). We have

conducted a likelihood-ratio test of the null hypothesis that branches 2-3 and 2-4 are equal using the JTT-F + dG model and the topology shown in Figure 6 without the global clock assumption (test carried out with the HYPHY program; Kosakovsky Pond and Muse 2000). The unconstrained model is significantly better than the model constraining the two branches to be equal ($-2\log = 3.54$; 1 *d.f.*, $P < 0.06$), meaning that the evolutionary distance between *Clostridium* and *Pseudomonas* is significantly shorter when measured from RNR class I, than when estimated from RNR classes II or III. Because, as we noted above, class I leads to unrealistically large estimates of the age of the duplications, it seems reasonable to assume that this class is in fact evolving slower than classes II and III. This result is consistent with the inference that the tree shown in figure 6 fits the global clock assumption (see above), because increases and decreases in the rate of evolution of each RNR protein could have cancelled out each other on the long term. There are at least two hypotheses to explain why class I appears to be evolving slower: i) a larger proportion of the amino acid sites of this protein might be submitted to purifying selection; yet, there is not an obvious reason why RNR class I should behave differently to RNR class II and III regarding adaptation, moreover considering the large evolutionary time involved; and ii) the gene encoding this protein could have arrived relatively recently to the genome of *Clostridium* by lateral transfer from *Pseudomonas*, or the other way around. There are two extreme points of view with regard to the importance of horizontal gene transfer in early evolution. The two notions nonetheless agree that for lateral transfer to occur, first the gene to be transferred should

confer a selective advantage on the recipient species; and/or second a strong selective environment favoring the growth and survival of the species containing the transferred gene should exist (see Gupta 1998). Considering the relevance of their metabolic role, together with different susceptibilities of RNR types to oxygen it seems fairly reasonable that at least the second scenario should have been a factor for lateral RNR transfer in the early times of evolution. Besides the unexpected closeness between classes I of *Clostridium* and *Pseudomonas* discussed above, lateral gene transfer (together with randomization of the phylogenetic signal) could account for the tangle-like configuration of the global tree shown in Figure 3; horizontal transmission might be most apparent from several highly supported statistically, yet erroneous relationships in this tree. For example the position of the archaea *Halobacterium sp* close to the eubacteria *Pseudomonas* and *Chlamydia* from *nrd I* (see Figure). In fact, lateral transfer from eubacteria has been hypothesized to explain the sudden appearance of ribulose-1,5-biphosphate, a very complex enzyme which is absent in all primitive archaea, in another halobacterium, *Haloferax mediterranei* (Rawal et al. 1988); moreover, another allegedly aerobic archaeobacteria (*e.g.*, *Thermoplasma acidophilum*, or *Pyrodictium*) are devoid of class I RNR (they carry solely class II). As we have already noted, so far *Halobacterium sp.* is the only archaea known to bear RNR class I; if we accept that *Halobacterium sp.* obtained its class I RNR by lateral transfer from an eubacterium (instead of vertically from the ancestor), it might be the case that archaeobacteria never had class I RNR. Put together, the considerations above lead to a hypothesis for the origin and subsequent

evolution of the different RNR classes. Based on Earth's geological history, the conditions under which the earliest organisms evolved were anaerobic. Because it can function solely under strict anaerobic conditions this would point to RNR class III as the primitive form from which derived all others. Nonetheless, class II RNR can function either with or without oxygen, such that this duality of class II might alternatively be the ancestral state, rather than a feature evolved later in evolution, e.g. as an adaptation to oxygenic environments. This scenario seems, however, quite unlikely: first, AdoCob, the molecule that activates class II RNR, is conspicuously more complex structurally than S-adenosylmethionine (AdoMet), the activator (together with an extra activator protein) of RNR class III; in fact, AdoMet has been dubbed poor man's AdoCob (Frey 1993) for this reason. Moreover, AdoCob biosynthesis involves many more steps, and enzymes (Roth, 1996) than AdoMet, whose production is comparatively straightforward. Second, RNR III relies upon a Fe-S cluster, located in the protein NrdG, to generate its glycyl radical; it is widely held that iron-sulfur clusters are one of the most ancient, ubiquitous and functionally diverse classes of biological prosthetic groups (Beinert, 2000), to the point that all chemical conversions of the primordial metabolism might have occurred on the surfaces of iron-sulfur minerals (Huber and Wächtershäuser, 1997). Third, the primitiveness of RNR III is also favored because this enzyme uses formate as external reductant (Torrents 2001), and this compound is much simpler than the thioredoxin and glutaredoxin system used by class II RNR. And fourth, class III RNR greatly resembles pyruvate formate lyase. PFL

catalyzes a key step in anaerobic energy metabolism thereby should have appeared early during the evolution of life (Reichard, 1997). It could then have occurred that an enzyme similar to present day class III reductase usurped the radical mechanism of a primitive form of the PFL to evolve into a ribonucleotide reductase; indeed, given the apparent structural similarity between the enzymes (Reichard 1997), the possibility that class III ribonucleotidase have evolved directly from duplication of the lyase can not be discarded. And fifth, Table 1 shows that an anaerobic microorganism can live indistinctly with class II or class III (e.g. *Methanococcus jannaschii* and *Chlorobium tepidum*); note that for these two species the whole genome has been sequenced, such that the possibility that they could have additional, non described *nrd* genes can safely be ruled out. Keeping this in mind, it is not clear which advantage could provide the origin of class III from class II. In principle, it makes more sense that class II originated from class III, allowing the exploitation of increasingly aerobic conditions. It seems, therefore, fairly sensible that RNR class III represents the primitive RNR class.

From our clock estimates, this ancestral form of class III RNR should duplicate very early in evolution to give place to class II RNR. Free of functional constraints, the extra copy of RNR class III could have evolved rapidly into class II; this process could have occurred only by changes in the C-terminal end of the protein, involving loss of the glycyl radical generator glycine residue, with concomitant acquisition of affinity for AdoCob (i.e., an oxygen independent radical generator). Freed of the constraints imposed by oxygen, this new RNR class would have allowed colonization of existing oxygenic environments. There is good

evidence that in Earth's early atmosphere traces of oxygen existed as a consequence of the photolysis of water, which could make possible the existence of localized oxygen oases (Kasting 1993). Both RNR classes coexisted until the ancestor split into archaea and eubacteria. The second duplication took place much later (about 2,200-2,000 My ago, according to our clock estimates from RNR classes II and III, respectively) in the eubacterial lineage, and gave place to class I from class II RNR. This would explain why current archaea seems to be devoid of class I RNR (except *Halobacterium*, which appears to have obtained its class I RNR by lateral transfer; see above). Note that our estimates place the date of the second duplication within the limits of the transition from a reducing to an oxygenic atmosphere, hypothesised to have occurred between 2300 and 1800 My ago; (Klein *et al.* 1992); therefore it seems very likely that RNR class I emerged coinciding with the establishment of a selectively favourable environment, especially because released the synthesis of deoxyribonucleotides from the need of AdoCob (note that AdoCob synthesis is restricted only to some bacteria and archaea; many animals and protists require AdoCob but they can not produce it, and plants and fungi neither synthesize nor use AdoCob in their metabolism; Roth *et al.*, 1996). In a latest step, fusion of a RNR class I-carrying-eubacteria with an archaea (Gupta 1998) would have originated an eukaryote cell bearing the three RNR classes; classes II and III would have however degenerated in most eukaryotes, with the concomitant development of aerobic metabolism. Also, because all eukaryote class I RNR pertain to the type Ia, it seems most plausible that class Ib RNR originated from class Ia in eubacteria after the

origin of the eukaryote cell. The derived status of RNR class Ib with regard to class Ia is also supported by the observation that class Ib is the only RNR lacking allosteric control.

ACKNOWLEDGEMENTS

F.R-T. has received support from the Spanish Council for Scientific Research (Contrato Temporal de Investigación) and Grant AGL2000-1073 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología to A. Ballester.

LITERATURE CITED

- Aloy, P., E. Querol, F. X. Aviles, M. J. E. Sternberg. 2001. Automated structure-based prediction of functional sites in proteins - Application to assessing the validity of inheriting protein function from homology in genome annotation and to protein docking. *J. Mol. Biol.* (submitted).
- Aloy, P., B. Oliva, E. Querol, F. X. Aviles, R. B. Russell. 2001. Structural similarity to link sequence space: Implications for Structural Genomics. *J. Mol. Biol.* (submitted).
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaeffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bateman, A., E. Birney, R. Durbin, S. R. Eddy, K. L. Howe, and E. L. Sonnhammer. 2000. The Pfam protein families database. *Nuc. Acids Res.* 28:263-266.
- Becker, A., K. Fritz-Wolf, K. Kabsch, J. Knappe, S. Schultz, and A. F. Volker Wagner. 1999. Structure and mechanism of the glycol radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat. Struct. Biol.* 6:969-975.
- Beinert, H, R. H. Holm, and E. Münck. 1997. Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science* 277:653-659
- Berglund, O. 1972. Ribonucleoside diphosphate reductase induced by bacteriophage T4: allosteric regulation of substrate specificity and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 247:7276-7281

- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, and P. E. Bourne. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28:235-242
- Castresana, J., and D. Moreira. 1999. Respiratory chains in the last common ancestor of living organisms. *J. Mol. Evol.* 49:453-460.
- Da-Fei, F., Cho, G., and R. F. Doolittle. 1997. Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:13028-13033.
- Doolittle, R. F., F. Da-Fei, S. Tsang, G. Cho, and E. Little. 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* 271: 470-477.
- Eliasson, R., E. Pontis, A. Jordan, and P. Reichard. 1999. Allosteric control of three B12-dependent (class II) ribonucleotide reductases. Implications for the evolution of ribonucleotide reduction. *J. Biol. Chem.* 274:7182-7189
- Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Regnstrom, K., Sjöberg, B-M. i Eklund, H. (1997). Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binbding. *Structure.* 5:1077-1092.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Freeland, S. J., R. D. Knight, and L. Landweber. 1999. Do proteins predate DNA?. *Science* 286:690-692.
- Frey, P. A. 1993. Lysine 2,3-aminomutase: is adenosylmethionine a poor man's adenosylcobalamin?. *FASEB J.* 7:662-670.
- Gleason, F. K., and H. P. Hogenkamp. 1970. Ribonucleotide reductase from *Euglena gracilis*, a deoxyadenosylcobalamin-dependent enzyme. *J. Biol. Chem.* 245:4894-4899
- Gupta, R. S. 1998. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, aubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1435-1491.
- Hillis, D. M., and J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42: 182-192.
- Huber, C., and G. Wächtershäuser. 1997. Activated Acetic Acid by Carbon Fixation on (Fe, Ni)S Under Primordial Conditions. *Science* 276:245-247
- Huelsenbeck, J. P., and K. A. Crandall. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 437-466.
- Jones, D. T., W. R. Taylor, J. M. Thornton. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* 8:275-282.
- Jordan, A., and P. Reichard. 1998. Ribonucleotide Reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:71-98
- Kasting, J. F. 1993. Earth's early atmosphere. *Science* 259:920-926.
- Kishino, H., T. Miyata, and M. Hasegawa. 1990. Maximum likelihood inference of protein phylogeny and the origin of chloroplasts. *J. Mol. Evol.* 31: 151-160.
- Klein, C., N. J. Beukes, H. D. Holland, J. F. Kasting, L. R. Kump, and D. R. Lowe. 1992. Proterozoic atmosphere and ocean. In: J. W. Schopf and C. Klein eds. *The Proterozoic Biosphere.* Cambridge University Press, New York. Pp 135-174.
- Kyrpides, N., Overbeek, R., and Ouzounis, C. 1999. Universal protein families and the functional content of the last universal common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49:413-423.
- Kosakovsky Pond, S. L., and S. V. Muse. 2000. HYPHY: Hypothesis Testing Using Phylogenies (kernel beta 0.71). University of Arizona. Distributed by the authors.
- Logan, D. T., J. Andersson, B. M. Sjöberg, and P. Nordlund. 1999. A glycil radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* 283:1499-1504.
- Murzin, A. G. 1993. Sweet-tasting protein monellin is related to the cystatin family of thiol proteinase inhibitors. *J. Mol. Biol.* 230:689-694.
- Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard, and C. Chothia. 1995. SCOP: a structural classification

- of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247:536-540.
- Nicholas K. B., H. B. Jr. Nicholas. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments *vs.* 2.6.2001. Distributed by the authors.
- Nikas, I., McLauchlan, J., Davison, A.J., Taylor, W.R., Clements, J.B. 1986. Structural features of ribonucleotide reductase. *Proteins.* 1:376-384.
- Patthy, L. 1999. *Protein Evolution.* Blackwell Science Inc. Malden, MA.
- Poole, A., Penny, D., Sjöberg, B.M. 2000. Methyl-RNA: an evolutionary bridge between RNA and DNA?. *Chem and Biol.* 7:R207-R216.
- Rawal, N., S. M. Kelkar, and W. Altekar. 1988. Ribulose 1,5-bisphosphate dependent CO₂ fixation in the halophilic archaebacterium, *Halobacterium mediterranei.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156:451-6
- Reichard, P. 1997. The evolution of ribonucleotide reduction. *Tibs* 22:81-85.
- Rodríguez-Trelles, F., R. Tarrío, and F. J. Ayala. 1999. Molecular evolution and phylogeny of the *Drosophila saltans* species group inferred from the *Xdh* gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13: 110-121.
- Rodríguez-Trelles, F., L. Alarcón, and A. Fontdevila. 2000. Molecular evolution and phylogeny of the *buzzatii* complex (*Drosophila repleta* group): a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1112-1122.
- Roth, J. R., J. G. Lawrence, and T. A. Bobik. 1996. Cobalamin (Coenzyme B₁₂): Synthesis and Biological Significance. *Ann. Rev. Microbiol.* 50:137-181.
- Russell, R. B. 1998. Detection of protein three-dimensional side-chain patterns: new examples of convergent evolution. *J Mol Biol.* 279:1211-1227.
- Russell, R. B., and G. J. Barton. 1992. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins* 14:309-323.
- Russell, R. B., P. D. Sasieni, and M. J. E. Sternberg. 1998. Supersites within superfolds. Binding site similarity in the absence of homology. *J. Mol. Biol.* 282:903-918.
- Sjöberg, B. M. 1997. Ribonucleotide reductases-A group of enzymes with different metallosites and a similar reaction mechanism. *Structure and Bonding* 88:139-173.
- Stubbe, J., and W. A. van der Donk. 1998. Protein Radicals in Enzyme Catalysis. *Chem. Rev.* 98:705-762.
- Stubbe, J., Ge, J., Yee, C.S. 2001. The evolution of ribonucleotide reduction revisited. *Tibs.* 26:93-99.
- Stutzenberger, F. 1974. Ribonucleotide reductase of *Pithomyces chartarum.* requirement for B₁₂ coenzyme. *J. Gen. Microbiol.* 81:501-503.
- Tamarit, J., Mulliez, E., Meier, C., Trautwein, A., Fontcave, M. 1999. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli.* The small protein is an activating enzyme containing a [4Fe-4S](2+) center. *J. Biol. Chem.* 274:31291-31296.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acids Res.* 25:4876-4882.
- Tollinger, M., R. Konrat, B. H. Hilbert, E. N. G. Marsh, and B. Kräutler. 1998. How a protein prepares for B₁₂-binding subunit of glutamate mutase from *Clostridium tetanomorphum.* *Structure.* 6:1021-1033
- Torrents, E., R. Eliasson, H. Wolpher, A. Gräslund, and P. Reichard. 2001. The ribonucleotide reductase from *Lactococcus lactis.* Interactions between the two proteins NrdD and NrdG. *J. Biol. Chem.* (Submitted).
- Uhlen, U., and H. Eklund. 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature.* 370:533-539.
- Woese, C. M. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271
- Xia, X. 2000. Data analysis in molecular biology and evolution. Department of Ecology and Biodiversity, University of Hong Kong
- Yang, Z. 1996a. The among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *TREE* 11:367-372

Yang, Z. 1996b. Maximum likelihood models for combined analyses of multiple sequence data. *J. Mol. Evol.* 42:587-596

Yang, Z. 2000. Phylogenetic analysis by maximum likelihood (PAML), *vs.* 3.0a University College London.

Yang, Z., I. J. Lauder, and H. J. Lin. 1995. Molecular evolution of the Hepatitis B virus genome. *J. Mol. Evol.* 41: 587-596.

Yang Z, R. Nielsen, M. Hasegawa. 1998. Models of amino acid substitution and applications to mitochondrial DNA evolution. *Mol Biol Evol* 15:1600-1611

6.9. Article IX

Caracterització genètica de la regió *nrdHIEF* que codifica la Ribonucleotidil-Reductasa de classe Ib de *Corynebacterium ammoniagenes*

Eduard Torrents, Ignasi Roca i Isidre Gibert

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina i Departament de Genètica i de Microbiologia.
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Espanya.

Abreviatures: RNR, ribonucleotidil reductasa; HU, hidroxidurea

Resum:

En la regió *nrd* es troben 5 ORF diferents que es transcriuen en tres trànscripats independents, *nrdHIE*, *nrdF* i un tercer que hem anomenat ORF. Els nivells del trànscrip *nrdF* són 10 vegades superiors als del *nrdHIE*, la seva expressió és de cicle cel·lular dependent i es troben sota el control d'un regulador anàleg a FUR i d'altres sistemes que responen a l'estrès oxidatiu. La proteïna codificada en l'ORF és un factor transcripcional de la família GntR que regula la transcripció de gens involucrats en el metabolisme del carboni.

Introducció

Les Ribonucleotidil-Reductases (RNR) catalitzen la reducció dels ribonucleòtids als seus corresponents desoxiribonucleòtids, necessaris per a la replicació i la reparació del DNA.

Fins al moment s'han descrit tres classes diferents de RNR (classes I, II i III) atenent la seva estructura, metall i cofactors requerits per a la catàlisi. Totes elles mantenen en comú la regulació al·lostèrica i la presència d'un radical

lliure proteic necessari per inicialitzar la reacció enzimàtica (Jordan, 1998).

La classe I sols és activa en condicions aeròbiques i es troba en totes les cèl·lules eucariòtiques i en alguns procarïotes i virus. Se subdivideix en dues subclasses (classes Ia i Ib) segons les diferències en la seva estructura primària i en la regulació al·lostèrica. Els gens *nrdA* i *nrdB* codifiquen per a les subunitats NrdA i NrdB de la subclasse Ia i els gens *nrdE* i

nrdF codifiquen per a les subunitats NrdE i NrdF de la subclasse Ib, respectivament.

La RNR de classe II, codificada en el gen *nrdJ*, és activa tant en presència com en absència d'oxigen. Es troba present en procariotes i en dues espècies d'eucariotes, el flagel·lat *Euglena gracilis* i el fong *Pithomyces chartarum* (Harder, 1993). El tret característic d'aquesta classe és la seva dependència per la S-adenosilcobalamina (AdoCob), que seria l'equivalent a les subunitats NrdB i NrdF de la classe I.

La RNR de classe III esta codificada en els gens *nrdDG* i són funcionals només en condicions d'anaerobiosi estricta. Es troba distribuïda tan sols en el món procariòtic. L'activació de la proteïna NrdD requereix de la S-adenosilmetionina (AdoMet), de la proteïna NrdG, que conté un *cluster* de ferro i sofre, del format i d'un sistema reductor que, *in vivo*, és el sistema de la flavodoxina i flavodoxina reductasa i que és substituït per la deazaflavina (DAF) *in vitro*.

Corynebacterium ammoniagenes és un bacteri Gram positiu no esporulat de baix contingut en %G+C. Pertany a la família dels micobacteris, és un microorganisme immòbil i de gran importància en la indústria, ja que s'utilitza per a la producció d'aminoàcids i nucleòtids (Collins, 1987).

Treballs previs realitzats al nostre laboratori ens han permès aïllar els gens *nrdH*, *nrdI*, *nrdE* i *nrdF* que codifiquen per a la RNR activa de *Corynebacterium ammoniagenes* i caracteritzar-la com una RNR de classe Ib (Fieschi, 1998.,

Huque, 2000). Antigament s'havia considerat aquesta RNR com una nova classe ja que depenia de manganès per al seu creixement.

Els gens *nrdEF* d'*E. coli* i *Salmonella typhimurium* s'han estudiat però són inactius i en canvi en aquest treball hem estudiat per primera vegada la regulació genètica dels gens *nrdEF* de *C. ammoniagenes* que codifiquen per a una RNR de classe Ib activa. Hem analitzat tant l'organització genètica com la regulació transcripcional sota diferents condicions fisiològiques.

Material i mètodes:

Soques, plasmidis i condicions de creixement:

Les soques i plasmidis d'*Escherichia coli* i *Corynebacterium ammoniagenes* i així com els oligonucleòtids utilitzats en aquest treball, es descriuen a les taules I i II. Les soques d'*E. coli* es van fer créixer en medi LB o TB a 37°C. El medi BHI (*brain infusion heart*, Oxoid) va ser utilitzat per al creixement de *C. ammoniagenes* a 37°C o a 30°C. Quan era necessari, els antibiòtics i substrats cromogènics eren suplementats en el medi de cultiu a les concentracions indicades a continuació: ampicil·lina 50 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, cloramfenicol 3 µg/ml, 5-brom-4-clor-3-indolil- -galactopiranosid (X-Gal) 30 µg/ml per al creixement d'*E. coli* i kanamicina 50 µg/ml i cloramfenicol 8 µg/ml per al creixement de *C. ammoniagenes*. Per obtenir condicions de deprivació de ferro, el medi era

Taula I. Soques utilitzades en aquest treball.

Soques	Genotip o característiques	Origen
<i>Escherichia coli</i> DH5	<i>recA1, endA1, hsdR17, supE44, thi-1, grA96, rdA1, (lacZYA-argF) U169, ΔcI80ΔlacZM15</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> MC1061	<i>araD139, Δ(ara-leu)7697, gdeE15, galK16, Δ(lac)X74, rpl(Str^r), hsdR2(r_K⁻, m_K⁺), McrA, mcrB1</i>	Lab. stock
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> WT	Type strain ATCC 6872	ATCC
Plasmids		
pBluescriptSK(+)	<i>E. coli</i> vector de donació i seqüenciació, Ap ^r .	Stratagene
pGEM-T easy	<i>E. coli</i> Vector per cbnar produces de PCR, Ap ^r .	Promega
pK18mob	<i>E. coli</i> vector de clonació, seqüenciació i per construir mutants, Kri ^r .	Schäfer et al (1994)
pCM502	Vector " <i>Pranta pcdē</i> " amb la zona sense promotor del gen de la -gal, Cm ^r .	Schmitt, M.P (1997)
pEK0	<i>E. coli</i> - <i>C. ammoniagenes</i> shuttle vector, Kri ^r .	Eikmanns et al (1991)
pEKE x2	<i>E. coli</i> - <i>C. ammoniagenes</i> vector d'expressió.	Eikmanns et al (1991)
pUA728	<i>Sac. C. ammoniagenes</i> fragment genòmic que conté la regió sencera <i>nrdEF</i>	Fieshi et al (1998)
pETS001	pCM502 que conté el promotor per el gen <i>nrdF</i>	Aquest treball
pETS002	pCM502 que conté el promotor per el gen <i>ORF</i>	Aquest treball
pETS003	pCM502 que conté el promotor per el gen <i>nrdHIE</i>	Aquest treball
pETS004	pEKEx 2 que conté el gen <i>ORF</i>	Aquest treball
pETS005	pK 18mob que conté un fragment del gen <i>nrdF</i>	Aquest treball
pETS006	pK 18mob que conté un fragment del gen per a un transportador de glucosa	Aquest treball
pETS007	pK 18mob que conté un fragment del gen <i>nrdE</i>	Aquest treball
pETS008	pCM502 que conté la regió promotora del gen <i>nrdE</i>	Aquest treball

suplementat amb l'agent quelant 2,2'-dipiridil (DIP) a una concentració final de 150 μM.

Tècniques generals de biologia molecular:

Les preparacions plasmídiques, digestions enzimàtiques, hibridació de DNA i les

recombinant va ser introduït en *E. coli* mitjançant transformació en cèl·lules competents de clorur de calci (Sambrook, 1989). Per a la purificació dels fragments de DNA, la banda es fonia a 50°C en NaI 6 M i es recuperava utilitzant el sistema *DNA Clean-up*

Taula II: Primers utilitzats en aquest estudi

Número	Nom	Seqüència
1	NrdHup	5'- ATGTCATCACTCTTAC -3'
2	NrdIup	5'- GTGCTGGTCGTGACTC -3'
3	NrdIlow	5'- TTTTAGCTGGCTTGTTTTTC -3'
4	NrdEup	5'- GTGACTCAACAA TTGG -3'
5	NrdElow	5'- CGTCAGCGTTTTTCGCGC -3'
6	Inter-Up	5'- GCAGATCTTCGCATGGCGC -3'
7	NrdFup	5'- GTGTCGAATGAATA TGACGAG -3'
8	Inter-Low	5'- GGATCTGTGTGGTTAGCG -3'
9	NrdFUp	5'- ACAGATCGTACATAAGGTCC -3'
10	Inter3273up	5'- GAGCGATCTTTGCTGTGCC -3'
11	ORFLow	5'- GTTGCTCCGCTTCA TCGCGC -3'
12	InterCory12lw	5'- CTGCAGGGAGGTTAAAC GTTTATG -3'
13	<i>lacZ</i> up	5'- ATGTCAGATGTGCGGCGAGTT -3'
14	<i>lacZ</i> low	5'- ATTC CCCAGCGACCAAGATGAT -3'
15	CoryProEup	5'- GTCGACCTACC GAATGTGCGG -3'
16	CoryProElow	5'- CCCGGGTGAAGCTGTAA GCGCGC -3'
17	CompFup	5'- AGAATTCTGTCTTACTACACA ACGG -3'
18	CompFlow	5'- AGGAATTCCGCCACCGTGCCC -3'
19	Cory16SUp	5'- GCAGCCGCGGTAA TACGTAGG -3'
20	Cory16SLow	5'- AAGGGGCATGATGATTT GACG -3'

lligacions es van realitzar segons les tècniques estàndards (Sambrook, 1989). El DNA

system (Promega). Per a la seqüenciació del DNA es va utilitzar el kit *BigDye Terminator*

Kit i el seqüenciador *ABI prism 310* (Applied Biosystem).

Electroporació de C. ammoniagenes.

Les cèl·lules electrocompetents es van obtenir a partir de cultius de *C. ammoniagenes* crescuts en 10 ml de medi LB a 30°C fins a una OD₅₅₀ de 0.4-0.6. En aquest punt, les cèl·lules es mantien en gel durant 5 minuts i a continuació, eren centrifugades a 5.000 rpm durant 10 minuts 4°C en un tub de polipropilè. El pèl·let era resuspès en 1 ml d'aigua destil·lada freda i després es transferia a un tub eppendorf i es tornava a centrifugar. El procés de rentat en 1 ml d'aigua estèril freda es repetia tres vegades més. En l'últim rentat es resuspensia el pèl·let en 1 ml de glicerol 10% i, finalment, després de centrifugar-lo una altra vegada, es resuspensia en 80 µl de glicerol 10% fred.

En l'electroporació s'utilitzaven 40 µl de cèl·lules electrocompetents que es barrejaven amb el DNA plasmídic (0.5-1 µg) en una cubeta d'electroporació freda (2 mm entre elèctrodes, *Biotechnologies and Experimental Research Inc., BTX*). L'electroporador utilitzat era del tipus *BTX Electro Cell Manipulator 600*. Les condicions varen ser: voltatge 2.500 V, resistència 326 . Després del pols elèctric, la solució es va resuspendre en 1 ml de BHI i es va incubar durant 3 hores abans de la sembra en placa.

Anàlisi transferència Southern.

El DNA cromosòmic de *C. ammoniagenes* va purificar-se segons el mètode descrit anteriorment (Fieschi, 1998). El DNA va ser digerit, separat en un gel d'agarosa al 0.7% i transferit per al buit sobre una membrana de niló. Es van utilitzar sondes de DNA específiques per al gen *nrdD* de *Lactococcus lactis*, el gen *nrdJ* de *Corynebacterium nephridii*, els gens *nrdE*, *nrdF* i *nrdI* de *C. ammoniagenes* i els gens *nrdAB*, *nrdJ* i *nrdDG* de *Pseudomonas aeruginosa*. Els corresponents fragments de DNA es van marcar mitjançant la tècnica de la PCR, utilitzant dUTP-digoxigenina. Es van utilitzar condicions d'alta estringència tant en les hibridacions com en els rentats tal com es descriu a (Torrents, 2000).

Construcció i anàlisi de les fusions gèniques amb lacZ:

Per a la construcció de la fusió transcripcional dels gens *nrdHIE* i la regió ORF-*nrdF* al gen *lacZ* es va utilitzar el plàsmid *promoter probe* pCM502 (Schmitt, 1997). Les regions promotores dels gens *nrdF* i ORF es troben molt properes entre elles, per això vam utilitzar en ambdós casos els primers 8 i 10 (taula II) que amplifiquen un fragment de 698 pb que posteriorment va ser clonat en el plàsmid pGEM-T *easy vector*. Aquest plasmidi va ser digerit amb *EcoRI* i l'insert alliberat va ser clonat en el plasmidi pBSK(+). L'orientació de l'insert, que correspon a cada un dels promotors dels gens *nrdF* i ORF, va ser determinada per restricció. El fragment

*Bam*HI-*Sa*I es va lligar al plasmidi pCM502 i es van generar els plasmidis pETS001 i pETS002 que contenen els promotors del gen *nrdF* i del gen ORF, respectivament. Per a la fusió *PnrdE-lacZ*, en primer lloc es va clonar un fragment *Eco*RV de 1.716 pb alliberat a partir del plasmidi pUA728 en el plasmidi pBSK(+). Aquesta construcció va ser digerida amb *Bam*HI-*Sa*I i es va clonar en el vector pCM502, i es va generar el plasmidi pETS003. L'anàlisi de l'activitat β -galactosidasa en *E. coli* es va realitzar per triplicat amb mostres permeabilitzades amb toluè i tant l'assaig com la determinació de les unitats enzimàtiques es realitzaren seguint el procediment descrit per Miller (Sambrook, 1989). Per a les determinacions a *C. ammoniagenes* les mostres es centrifugaven i es resuspenien en tampó Z. Després de sonicar les mostres, es mesurava l'activitat β -galactosidasa de la mateixa manera que en *E. coli* però amb la diferència que les unitats enzimàtiques es corregien per la quantitat de proteïna total de la mostra emprada. Per determinar si en el transcrit *nrdHIE* hi havia un promotor intern per davant del gen *nrdE* es va clonar la regió 5' d'aquest gen mitjançant els *primers* 15 i 16 i es va clonar en el vector pCM502 mitjançant les dianes *Bam*HI-*Sa*I, així es va generar el plasmidi pETS008.

Manipulació i anàlisi de l'RNA:

L'RNA total de *C. ammoniagenes* va ser aïllat utilitzant el kit *High Pure RNA Isolation Kit*

(Roche) seguint el protocol de la casa comercial.

Per a la síntesi del cDNA es va utilitzar l'enzim AMV (Promega) i una alíquota de l'RNA extret (3 μ g). La reacció es va dur a terme segons el protocol detallat per (Jordan, 1996), amb la diferència que la temperatura de la síntesi del cDNA va ser de 48°C. Després de la RT-PCR totes les mostres eren comprovades per tal de descartar que estiguessin contaminades de DNA mitjançant amplificació per PCR sense afegir-hi AMV. Per la semiquantificació el competidor per al gen *nrdF* de 550 pb es va generar utilitzant els *primers* 17-18 i 7-9 i es va generar una deleció interna de 200pb. Per al competidor del gen *nrdE* (de 630 pb) es va clonar el fragment generat pels *primers* 4 i 5 en el vector pGEM i posteriorment es va autolligar una digestió *Eco*RI, amb la qual cosa es va generar una deleció de 220 pb.

Anàlisi transferència Western:

Per a l'extracció de les proteïnes totals els cultius de *C. ammoniagenes* crescuts fins a una OD₆₀₀ de 0.4-0.6 van ser centrifugats i resuspesos en 10 μ l d'una solució de 10 mM TrisHCl pH=7.5 i 10 mg/ml de lisozim. Les mostres es van incubar a 37°C durant 15 minuts i s'hi van afegir 50 μ l de solució de *cracking* (0.5 M TrisHCl pH=8, 10% SDS, 5% v/v 2-mercaptoetanol i 0.1% blau de bromofenol) i es van bullir durant 10 minuts.

Després de centrifugar-ho, les proteïnes es van resoldre mitjançant un gel SDS-PAGE al 7.5%

i es van electrotransferir a membranes de nitrocel·lulosa (Bio-Rad) utilitzant un Mini-Protean II system (Bio-Rad) seguint el protocol del fabricant. Les membranes varen ser bloquejades tota la nit a 4°C utilitzant llet en pols descremada dissolta al 3% (wt/vol.) en PBS. L'anticòs policlonal primari (anti-NrdF de *S. typhimurium*) va ser utilitzat a una dilució 1:200. L'anticòs secundari *anti-rabbit IgG(H+L)* marcat amb peroxidasa va ser utilitzat a una dilució 1:3000. El complex antigen-anticòs va ser detectat utilitzant el kit *BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)* de *Roche Molecular Biochemicals* seguint el protocol del fabricant. L'anticòs monoclonal anti-β-galactosidasa va ser utilitzat a 100 ng/ml.

Sobreexpressió de l'ORF present a la regió nrdHIEF en E. coli i C. ammoniagenes:

Per poder sobreexpressar la hipotètica proteïna codificada en l'ORF, present en la regió *nrdHIEF* de *C. ammoniagenes*, vàrem utilitzar el vector d'expressió pEKEx2 (Eikmanns, 1991), que conté el promotor *Ptac*, que permet sobreexpressar la proteïna ORF tant en *E. coli* com en *C. ammoniagenes*.

La seqüència sencera de l'ORF es va determinar mitjançant PCR, utilitzant el parell de *primers* 10 i 12 que inclouen la seqüència del RBS i l'ATG de l'inici de traducció i el codó final d'aquest ORF. El producte amplificat, de 952 pb, va ser clonat en el pGEM-T. Aquest va ser digerit amb *PstI-EcoRI* i el fragment alliberat va

ser lligat darrere el promotor *Ptac* del vector pEKEx2, i es va generar el vector pETS004.

Obtenció de mutants a C. ammoniagenes.

Per a la construcció dirigida de mutants en *C. ammoniagenes* vam utilitzar el mètode d'intercanvi genètic descrit per (Schäfer, 1994). Breument el fragment de DNA de la regió a mutagenitzar es clona en el vector pEK18mob que no es replicatiu a *C. ammoniagenes*.

Es va amplificar un fragment dels gens *nrdF* i *nrdE* mitjançant la parella de *primers* 7-9 i 4-5 i es van clonar en el vector pEK18mob i es van obtenir el plasmidis pETS005 i pETS007, respectivament. Al mateix temps un fragment *BamHI* de 918 pb del plasmidi pUA728 que codifica per a un transportador de glucosa que es troba per davant del gen *nrdH*, es va clonar en el vector pEK18mob i es va obtenir el plasmidi pETS006. Aquests plasmidis es van introduir per electroporació a *C. ammoniagenes* i la selecció de les possibles integracions es va fer sobre plaques de kanamicina.

Anàlisi de les dades i imatges:

Les imatges dels gels van ser capturades amb l'estació *Gel Doc 2000* utilitzant el programa informàtic *Quantity One* (Bio-Rad). Per a les RT-PCR semi-quantitatives es va quantificar la intensitat individual de cada banda normalitzant-la respecte al seu *background*.

Resultats i discussió

C. ammoniagens conté tan sols la RNR de classe Ib:

En un treball anterior realitzat pel nostre grup (Fieschi, 1998) es van clonar els gens que codifiquen per a la RNR activa de classe Ib (*nrdH*, *nrdI*, *nrdE* i *nrdF*) de *C. ammoniagens*. En el present treball el primer objectiu va ser establir si aquesta era l'única RNR present en aquest bacteri. Altres espècies relacionades contenen diferents classes de RNR; així, *Corynebacterium nefridi* conté el gen *nrdJ* i *Corynebacterium diphtheriae* conté dues còpies dels gens *nrdEF*.

Per determinar la presència d'altres RNR a *C. ammoniagens* vàrem realitzar una anàlisi mitjançant hibridació heteròloga (transferència *southern*) utilitzant sondes de DNA per a les diferents classes de RNR, tal com es descriu en el material i mètodes. Així, el DNA genòmic de *C. ammoniagens* va ser digerit amb diferents enzims de restricció (*Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Mlu*I, *Sac*I i *Sma*I) i analitzat per hibridació utilitzant les sondes *nrdA* de *Salmonella typhimurium* i *Pseudomonas aeruginosa*, *nrdJ* de *C. nefridi* i *P. aeruginosa*, *nrdD* dels Gram positius *Lactococcus lactis* i *Streptococcus pyogenes*, i *nrdE* i *nrdF* de *C. ammoniagens*. Aquestes últimes sondes es varen utilitzar per determinar si hi havia alguna còpia addicional dels gens *nrdEF*. No vàrem obtenir cap resultat positiu d'hibridació excepte per als gens *nrdEF* de *C. ammoniagens*, per als quals només es va obtenir una única banda. Aquests resultats confirmen que *C. ammoniagens* conté

una única classe de RNR, del tipus Ib, i només se'n presenta una còpia. Per poder descartar totalment la possible presència d'altres RNR i comprovar els resultats anteriors, vàrem decidir construir mutants per als gens que codifiquen la RNR de *C. ammoniagens*. En ser les RNR essencials, els mutants per a la reductasa seran inviables a no ser que existeixi alguna RNR addicional activa en la cèl·lula. Quan es volia aïllar algun mutant per als gens *nrdF* i *nrdE*, utilitzant els plasmidis pETS005 i pETS007, mai no es va obtenir cap clon. El control positiu per l'obtenció de mutants es va realitzar clonant un petit fragment que codifica per a un transportador de glucosa localitzat just per davant del gen *nrdH*. En aquest cas, sí que es varen obtenir clons kanamicina resistents, corresponents a la inserció del plasmidi pETS006 en aquest punt (es va comprovar mitjançant transferència *southern*). Així, corroborarem que els gens que codifiquen per a la RNR de classe Ib són essencials per al creixement ja que no s'ha pogut obtenir mutants d'aquests gens i són l'única RNR present a *C. ammoniagens* segons l'anàlisi per transferència *southern*.

Anàlisi transcripcional:

La regió genòmica que inclou els gens *nrdH*, *nrdI*, *nrdE* i *nrdF* en *C. ammoniagens* difereix de l'estructura genòmica *nrdHIEF* que podem trobar en formant un operó amb un únic promotor en enterobacteris (Jordan, 1996b). La principal peculiaritat que trobem d'aquests gens

en *C. ammoniagenes* és la presència d'un espai intergènic de 1.2 kpb entre els gens *nrdHIE* i el gen *nrdF* (figura 1a).

Amb la intenció de determinar si el conjunt de gens formen una única unitat transcripcional sota el control d'un únic promotor, es va utilitzar la tècnica de la RT-PCR per poder realitzar l'anàlisi dels possibles trànscrips d'aquesta regió. No es va detectar cap mena de trànscrip mitjançant transferència Northern. La

nostra hipòtesi parteix amb la possibilitat que hi hagi un trànscrip que s'estén des del gen *nrdH* fins al gen *nrdF* (trànscrip B). Esperariem que utilitzant el *primer* 9 en el procés de la síntesi del cDNA podríem detectar amplificació utilitzant qualsevol parella de *primers* pels gens *nrdH*, *nrdI*, *nrdE* i *nrdF*. Aquest no va ser mai el cas ja que no es va detectar cap banda d'amplificació, per tant teníem la sospita que no hi hauria un sol trànscrip en aquesta regió.

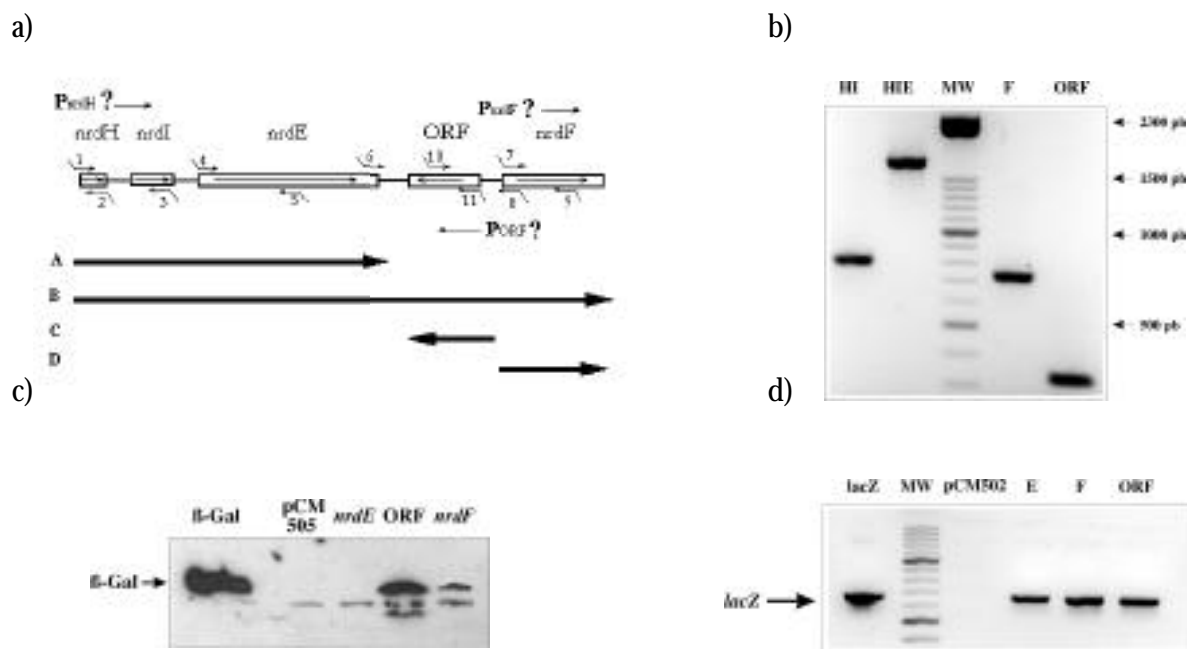


Figura 1. a Representació esquemàtica de la regió genòmica dels gens *nrd* en *C. ammoniagenes*. Els hipotètics trànscrips es representen com a A, B, C i D. b Trànscrips detectats mitjançant RT-PCR. El *primer* 5 va ser utilitzat en la síntesi del cDNA per als trànscrips HIE (*primers* 1 i 3; 790 pb, carril HI i *primers* 1 i 5; 1718 pb, carril HIE), el *primer* 9 per al cDNA del trànscrip F (*primers* 7 i 9; 719 pb) i el *primer* 10 per al cDNA del trànscrip ORF (*primers* 10 i 12; 325 pb). c Expressió β -galactosidasa mitjançant transferència *Western* a partir dels promotors P_{nrdHIE} , P_{nrdF} i P_{orf} . b). d Expressió del gen *lacZ* a partir dels promotors P_{nrdHIE} , P_{nrdF} i P_{orf} mitjançant RT-PCR i utilitzant el *primer* 14 per a la síntesi del cDNA i *primers* 13 i 14 per a les PCR.

Així, tal com es descriu en el material i mètodes i utilitzant els *primers* 5, 9 i 10 (figura 1a) per a la síntesi dels cDNA, es va poder detectar la transcripció conjunta dels gens *nrdH*, *nrdI* i *nrdE* (figura 1b, carrils HI i HIE). Sorprenentment el gen *nrdF* es transcriu independentment als gens anteriors (carril F). Finalment, es va trobar un transcrit a partir de la cadena complementària que correspon a la transcripció de l'ORF (carril ORF). Per estudiar els promotors dels transcrits detectats, vàrem construir fusions gèniques mitjançant la clonació de les regions promotores (*PnrdHIE*, *PnrdF* i *Porf*) davant del gen *lacZ* (absent de promotor) present en el vector *promoter-probe* pCM502. Els plasmidis pETS001, pETS002, pETS003 es van transformar a *C. ammoniagenes*. Mitjançant transferència *western* i utilitzant un anticòs monoclonal anti- β -galactosidasa, es va poder detectar l'expressió d'aquesta proteïna a partir dels promotors *PnrdF* i *Porf* (figura 1c) però no a partir del promotor *PnrdHIE*. Vam pensar que la transcripció a partir del promotor *PnrdHIE* no era prou alta com per produir suficient proteïna perquè fos detectada per *western*. Per això vàrem decidir utilitzar una tècnica més sensible, encara que no quantitativa, per esbrinar si el transcrit es produïa. Així, analitzant les mateixes fusions mitjançant RT-PCR i utilitzant *primers* pel gen *lacZ* (13 i 14), sí que es va poder

detectar transcripció a partir del *PnrdHIE*, tal com es mostra a la figura 1d. Utilitzant el plasmidi pETS008 mai es va detectar expressió β -galactosidasa indicant-nos l'absència d'un promotor intern davant el gen *nrdE*.

Expressió dels gens nrdF i la proteïna ORF durant el cycle cel·lular:

Els dNTP es requereixen principalment quan la cèl·lula s'està dividint, per tant és d'esperar que el control genètic dels gens *nrd* estiguin sotmesos al control dependent del cycle cel·lular. El nostre objectiu era esbrinar si els gens *nrd* estaven regulats en funció de l'estat de la cèl·lula. Així, vàrem realitzar l'anàlisi β -galactosidasa a partir de cèl·lules de *C. ammoniagenes* transformades amb els plasmidis pETS001 i pETS002 portadores de les fusions *nrdF* i el ORF segons com es descriu en el material i mètodes. L'anàlisi transcripcional de l'expressió del gen *nrdF* al llarg del cycle cel·lular (figura 2) mostra una dependència clara del cycle cel·lular. Durant les fases inicials del creixement, on hi ha el màxim requeriment de dNTP per part de la cèl·lula, hi ha un increment dels nivells d'expressió dels gens que codifiquen per a la RNR. Aquests nivells d'expressió són mínims a la fase estacionària.

D'altra banda, l'estudi de l'expressió del gen *ORF* es veu que segueix un patró paral·lel a la cinètica de creixement d'aquest microorganisme, i es dona la màxima

expressió al final de la fase exponencial i durant la fase estacionària.

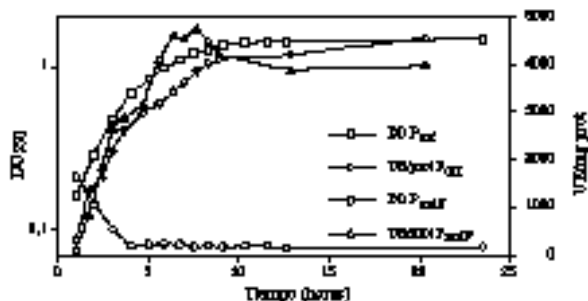


Figura 2. Cinètica de creixement i nivells transcripcionals dels gens *nrdF* i *orf* en *C. ammoniagenes*. Es representen les cinètiques de creixement en DO, densitat òptica mesurada a 550 nm i els valors -galactosidasa corresponents a les fusions es representen en funció de les unitats enzimàtiques dividit per la concentració de proteïnes (UE/mg prot).

Regulació transcripcional del sistema EF en C. ammoniagenes:

Els senyals detectats mitjançant transferència *Western* (figura 1c) ja ens indicaven que els nivells d'expressió que trobem per al transcrit *nrdHIE* són menors que per al transcrit *nrdF*. La quantitat de transcrits *nrdHIE* i *nrdF* es va du a terme mitjançant l'anàlisi RT-PCR semiquantitatiu. En totes les quantificacions es posa una quantitat constant de competidor (vegeu l'apartat material i mètodes). La presència de molècules híbrides (h, figura 3a) correspon al resultat de la hibridació de molècules del competidor i del transcrit amplificat (mRNA). El càlcul del ratio competidor (c, figura 3a) i transcrits amplificats (t, figura 3a) es determinen mitjançant densitometria per a cada mostra analitzada i les seves variacions ens indica les diferències en els nivells dels transcrits (mRNA) original (Jordan, 1996b).

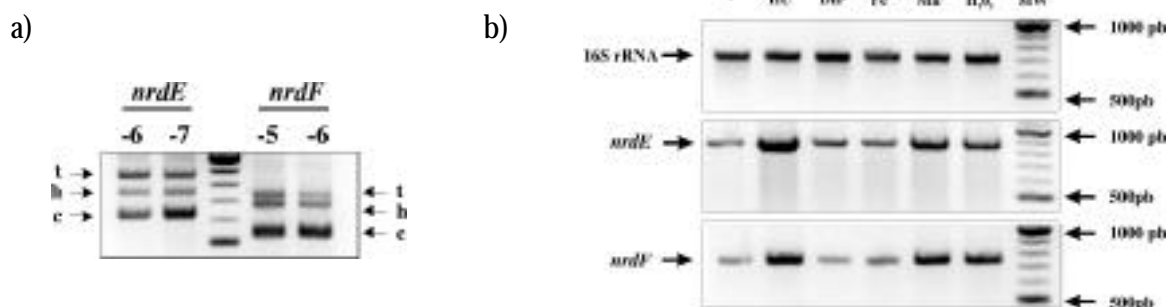


Figura 3. a RT-PCR semiquantitativa dels transcrits *nrdE* i *nrdF*. Els valors representen les dilucions de DNA competidor utilitzades. Les etiquetes corresponen a: t, cDNA; h, híbrid cDNA/competidor; c, DNA competidor. Les dilucions de competidor utilitzades van ser la -6 i -7 per la quantificació del transcrit *nrdE* i -5 i -6 per el transcrit *nrdHIE*. **b** RT-PCR dels gens 16S rRNA, *nrdE* i *nrdF* sota condicions inductores. - Nivell basal sense induir, DIP 300 µM, FeCl₃ 50 µM, MnCl₂ 100 µM, HU (hidroxiurea) 100 mM i H₂O₂ (peròxid d'hidrogen) 2 mM final.

L'anàlisi semiquantitativa mitjançant RT-PCR (figura 3a) mostra un nivell transcripcional deu vegades superior per a l'mRNA del gen *nrdF* en relació amb mRNA del transcrit *nrdHIE*. Així, el nivell del transcrit *nrdHIE* serà la que determinarà l'activitat RNR durant el creixement cel·lular. A la figura 3b es mostra l'anàlisi transcripcional del sistema de classe Ib sota condicions que presumiblement podrien alterar l'expressió d'aquests gens. Volíem veure si aquests gens es troben sota el control de reguladors transcripcionals que responen a condicions d'estrès oxidatiu i de privació de ferro. Com es pot veure en el material i mètodes es va extraure el RNA total de cèl·lules crescudes de *C. ammoniagenes* on en el medi de cultiu contenia peròxid d'hidrogen (H₂O₂), hidroxidrea (HU), Fe³⁺ o Mn²⁺. La diferència dels nivells d'expressió dels transcrits es va realitzar mitjançant RT-PCR semiquantitativa, utilitzant el 16S rRNA (amplificat utilitzant els primers 19 i 20) com a patró d'amplificació, estandardització de les extraccions de RNA i de les reaccions de RT i PCR. A la figura 3b es mostra l'anàlisi transcripcional realitzat sota les diferents condicions analitzades. A la taula III es poden veure els nivells d'inducció calculats a partir de l'anàlisi densitomètrica de les bandes obtingudes a la figura 3b i tenint com a nivell basal el resultat obtingut del cultiu no tractat. Era evident la inducció per HU, ja que és un inhibidor de les RNR

de classe I. L'estimulació per H₂O₂ ens indica la possible participació del sistema oxidatiu dependent d'OxyR/SoxRS en el control transcripcional de la RNR. L'increment en l'expressió en presència dels ions Fe³⁺ i Mn²⁺ podria indicar la participació de factors transcripcionals del tipus Fur/DtxR. Recentment s'han trobat reguladors transcripcionals com per exemple SirR, TroR i IdeR, que serien els homòlegs a la proteïna Fur d'enterobacteris o DtxR de *C. diphtheriae* que respondrien als nivells de manganès intracel·lular (Hill, 1998., Posey, 1999., Schmitt, 1995). Es conegut que les corynebacteries requereixen de manganès pel seu creixement i per la replicació del DNA (Willing, 1988). En aquest treball hem vist que es requereix ions manganès per induir la transcripció de la RNR la qual es necessària per produir els dNTP que es requereixen per a la replicació del DNA.

Taula III. Factor d'inducció dels gens *nrdHIE* i *nrdF*.

	<i>nrdE</i>	<i>nrdF</i>
-	-	-
HU	7.6	6.6
DIP	1.4	-
Fe ³⁺	1.4	2.3
Mn ²⁺	5	6
H ₂ O ₂	3.6	5.5

Expressió de les fusions en E. coli:

Hi han caixes reguladores de DNA prou conservades com per ser reconegudes

heteròlogament per factors de transcripció d'altres organismes. Volíem veure l'expressió dels gens *nrd* sota el fons genètic d'un Gram-negatiu com *E. coli*. Els plasmidis pETS001 i pETS002 van ser transformats en la soca d'*E. coli* MC1061. Les soques transformades van ser tractades amb HU, Fe³⁺, Mn²⁺, DIP i H₂O₂ i es van analitzar els nivells de β -galactosidasa. L'expressió del promotor *nrdHIE* no fou detectada mitjançant l'assaig β -galactosidasa en *E. coli*. D'aquesta manera es corrobora l'expressió tan baixa del transcrit *nrdHIE* en *C. ammoniagenes*. A la taula IV es poden veure els nivells d'inducció de les diverses fusions sota les diferents condicions de creixement. El gen *nrdF* s'expressa en presència d'HU, H₂O₂ i de DIP en el medi. Així, aquest gen en *C. ammoniagenes* està regulat en *E. coli* per un sistema induït per estrès oxidatiu i pel sistema FUR. L'anàlisi mitjançant el sistema de promotors regulats per Fur (FURTA) en *E. coli* (Stojiljkovic, 1984) mostra que la possible caixa FUR present en el promotor del gen *nrdF* de *C. ammoniagenes* podria ser reconeguda per la proteïna FUR d'*E. coli* (resultat no mostrat). Aquests resultats es corresponen amb els obtinguts per la Dra. Pueyo i els seus col·laboradors (Monje, 2001), que han determinat recentment que l'operó *nrdHIEF* d'*E. coli* s'expressa en resposta a l'estrès oxidatiu. Al nostre laboratori hem obtingut resultats equivalents en la regulació de

l'expressió dels gens *nrdHIEF* de *S. typhimurium* que, a més a més, presenten clarament una caixa FUR en el seu promotor i estan fortament regulats per aquest regulador transcripcional. Tal com ja havíem determinat en *C. ammoniagenes*, l'expressió màxima d'aquests gens es dona al principi de la fase exponencial del creixement del bacteri.

Anàlisi de les seqüències promotores:

En aquest treball hem pogut veure que els gens *nrdEF* de *C. ammoniagenes* tant en *E. coli* com en *C. ammoniagenes* estan regulats per un sistema que respon a estrès oxidatiu i per FUR. Això indica la presència de seqüències d'unió per a aquests reguladors a la zona promotora. La regió promotora dels gens *nrdE* i *nrdF* (figura 4a i 4b) mostra les possibles regions promotores -10 i -35. De la mateixa manera s'hi poden veure les regions d'unió als ribosomes (RBS). Els hipotètics inicis de transcripció s'han obtingut mitjançant un algoritme per predir les posicions +1 (www.fruitfly.org/cgi-bin). La similitud més gran d'aquesta regió es dona amb la caixa reguladora DtxR (65%) de *C. diphtheriae* (figura 4c). Anomenarem aquestes regions de *C. ammoniagenes* caixes DtxR-like sent possiblement els llocs d'unió d'un regulador transcripcional sensible als nivells de manganès.

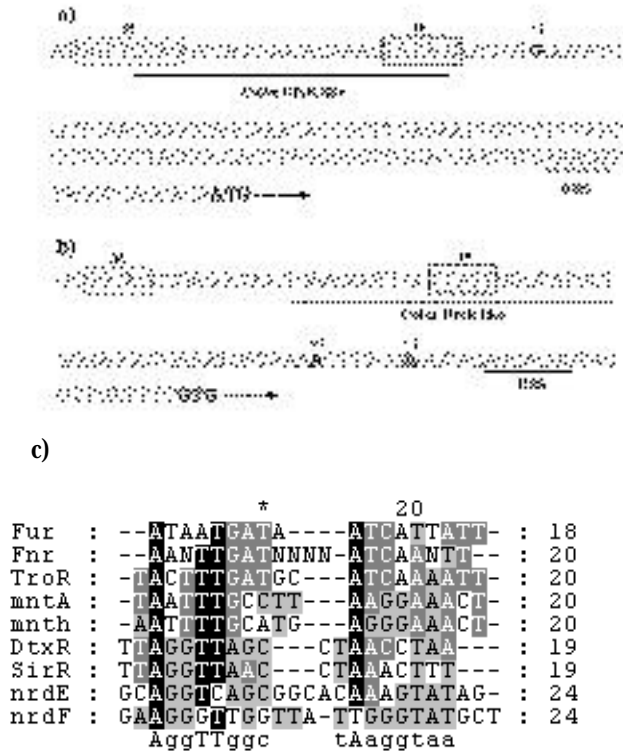


Figura 4. Seqüència de les regions promotores dels gens *nrdE* a) i *nrdF* b) En negra es marquen els possibles +1. Es marquen les hipotètiques regions que regulen la possible inducció per manganès. C) Comparació de les caixes *DtxR-like* amb altres reguladors involucrats en el metabolisme del ferro i el manganès.

El gen ORF no participa en la transcripció del gen nrdF

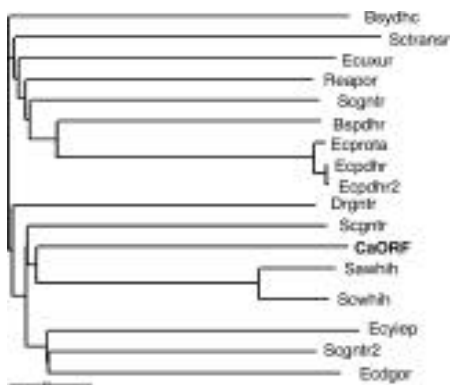
Per determinar si l'expressió de l'ORF afectava la transcripció dels gens que codifiquen la RNR de classe Ib vàrem construir un sobreproductor per a la proteïna codificada en el ORF en *C. ammoniagenes* i vam analitzar com afectava a l'expressió del gen *nrdF*. Així, el plasmidi

pETS004 va ser transformat en cèl·lules competents de *C. ammoniagenes*. Aquesta soca mostrava una banda sobreexpressada de la proteïna ORF en un gel SDS-PAGE. Mitjançant transferència *western*, es va determinar que no hi havia cap diferència en els nivells d'expressió del gen *nrdF* cromosòmic al llarg de tot el procés d'inducció. Es van utilitzar pel revelat anticossos de conill policlonals anti-NrdF de *S. typhimurium*. Com a control es va utilitzar una soca de *C. ammoniagenes* portadora del plasmidi pEKEx2 sense l'ORF (no mostrat).

El gen ORF codifica per a un factor transcripcional de la família GntR.

L'anàlisi de la seqüència d'aminoàcids codificada en el gen *ORF* indica un alt grau de similitud amb una família de repressors bacterians (*GntR-like*) (figura 5a) (Haydon, 1991). Aquests factors de transcripció solen actuar reprimint operons i gens implicats en la regulació d'intermediaris del metabolisme del carboni. Les prediccions d'estructura secundària (<http://www.expasy.ch/tools>) ens indiquen que es tracta d'una regió d'unió al DNA del tipus *Hèlix-Torn-Hèlix* (H-T-H), segons l'alineament amb proteïnes d'aquesta família (Figura 5b). Aquesta possible funció del producte ORF reforçaria el paral·lelisme detectat entre els nivells d'expressió de l'ORF i la fase de creixement en la qual es troba el microorganisme (figura 2).

a)



b)

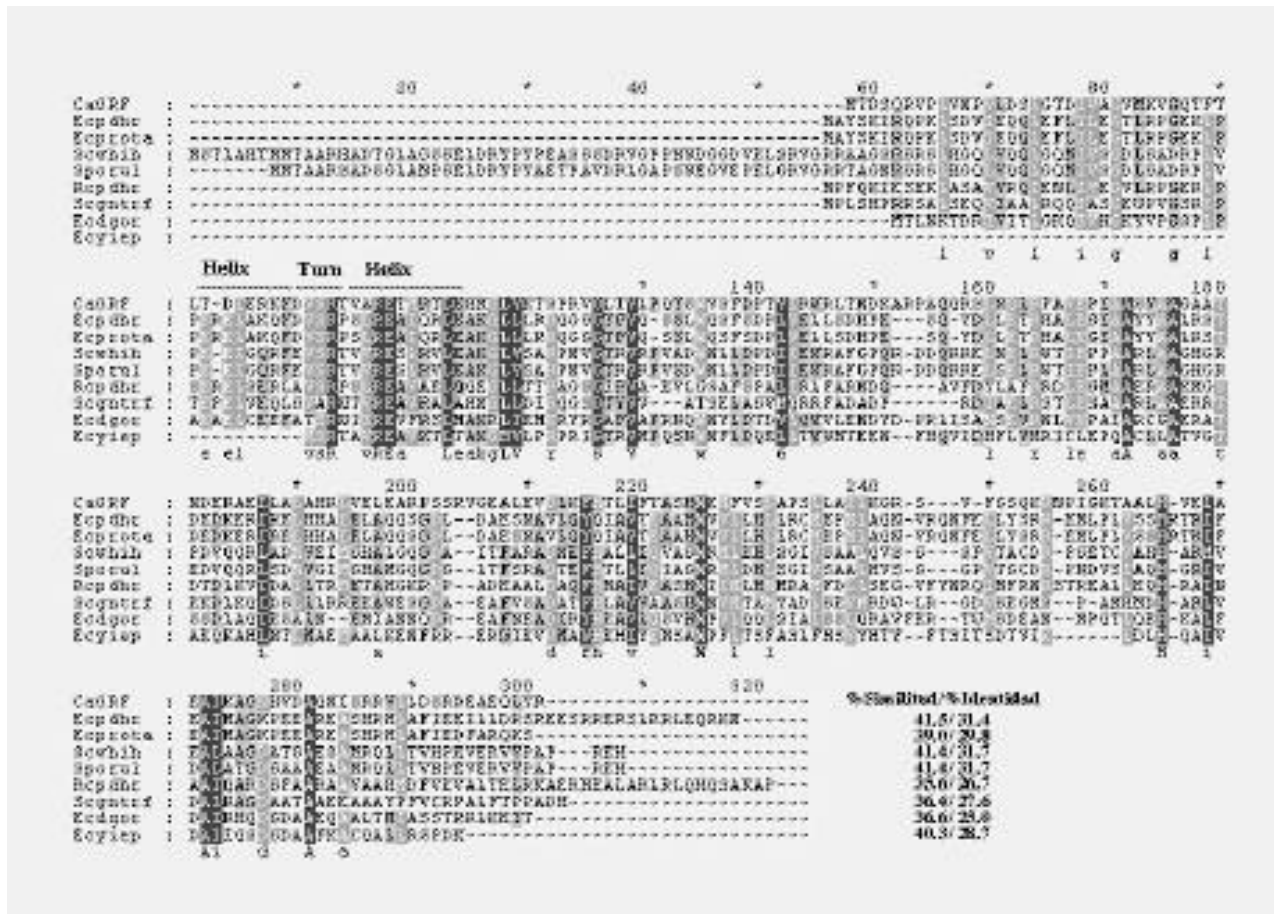


Figura 5. a) Relació filogenètica entre la proteïna ORF i factors de transcripció de la família GntR. **b)** Alineament de les seqüències proteiques de la família GntR. L'alineament es va realitzar mitjançant el programa ClustalX. Codis d'accés: CaORF (Y09572), Bsydhc (D88802), Sctransr (AL009204), Ecuxur (P39161), Reapor (AF181498), Scgntr (AL096844), Bspdhr (D88802), Ecprota (D26562), Ecpdhr (I53482), Ecpdhr2 (AE000120), Drgntr (E75471), Scgntr (AL117387), Sawhiih (AF096293), Scwhiih (AJ003022), Ecyiep (P31475), Scgntr2 (T36777), Ecdgor (P31460), Sporul (AL009204).
Estructura dels operons de la classe Ib:

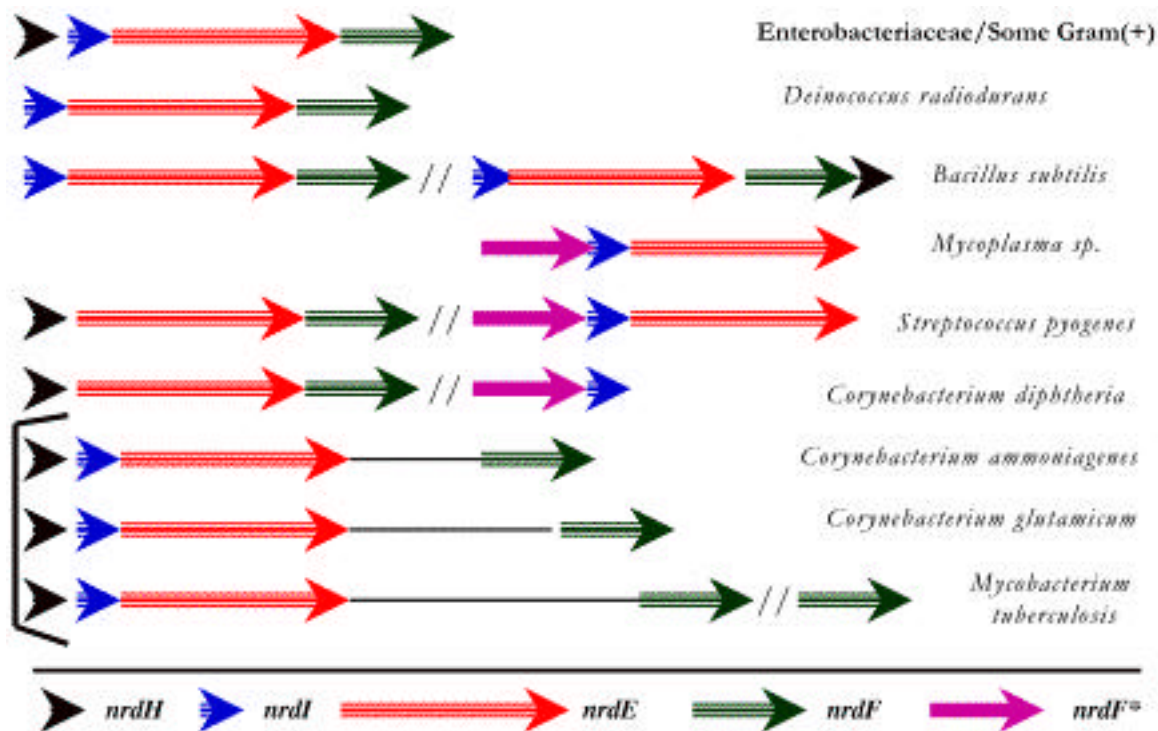


Figura 6. Representació esquemàtica de les diferents estructures que poden presentar els gens del sistema de les RNR de classe Ib. Es marca amb un * la còpia *nrdF* que no presenten els residus conservats involucrats en l'unió del ferro.

Un tret característic que presenten les RNR de classe Ib és la seva organització genòmica. Així, junt amb els gens *nrdE* i *nrdF*, que codifiquen per a la RNR activa, sempre hi trobem una proteïna anomenada NrdI, que és essencial per al sistema (Irma Sala, comunicació personal) però amb funció ara per ara desconeguda, encara que possiblement intervingui en la reacció de reducció dels NTP (Jordan, 1997). També hi trobem el gen *nrdH* però aquest no es troba present en tots els organismes que presenten aquesta classe de RNR i, per tant, això indica la no-universalitat de la proteïna NrdH com a donador d'electrons específic per a aquest sistema. A la figura 7 es mostren les possibles organitzacions genòmiques que

podem trobar per a les RNR de classe Ib. Els enterobacteris i alguns Gram-positius presenten l'organització característica, en què es troben els gens *nrdH*, *nrdI*, *nrdE* i *nrdF* junts, en aquest ordre i aparentment formant una única unitat transcripcional. Un altre grup de bacteris conté una còpia atípica del gen *nrdF*, ja que codifica per a una proteïna a la qual hi manquen els aminoàcids necessaris per a la unió del ferro, la qual cosa cal per iniciar la formació del radical tirosil. Sorprenentment, tots ells presenten la mateixa organització genòmica, on es troba el gen *nrdF* atípic, després el gen *nrdI* i finalment el gen *nrdE*. Les espècies *Mycoplasma sp* sols conté una còpia *nrdFIE* que és essencial per al seu creixement (Hutchison III, 1999). *S. pyogenes* i *C.*

diphtheriae, a part de la còpia *nrdFIE*, contenen una còpia addicional dels gens *nrdH*, *nrdE* i *nrdF*, i aquesta darrera proteïna té tots residus conservats involucrats en la unió de ferro en les proteïnes R2(F) de la classe Ia i Ib. Finalment, trobem l'organització característica dels bacteris de la família dels micobacteris, *Mycobacterium tuberculosis*, *C. diphtheriae* i *C. ammoniagenes*, on existeix una regió intergènica entre els gens *nrdE* i *nrdF*. En tots els casos trobem junts els gens *nrdHIE*, després una regió intergènica de mida variable segons el microorganisme i en darrer terme el gen *nrdF*. *M. tuberculosis* conté una còpia addicional del gen *nrdF*. En el cas de *C. ammoniagenes* malgrat hem demostrat que els trànscrips *nrdHIE* i *nrdF* es transcriuen independentment, tots dos es troben regulats pels mateixos reguladors transcripcionals, per tant, podem pensar que en tots aquests darrers microorganismes es comportin de la mateixa manera que en *C. ammoniagenes*. Degut a que aquesta organització genòmica sols es troba en aquesta família de bacteris podem pensar que aquests tipus d'estructura ja es trobava en un ancestre comú. Al llarg de l'evolució de cada organisme el que ha variat és la grandària i el tipus de gen que hi ha en la regió intergènica. Fins ara sols s'ha estudiat la regulació genètica dels gens *nrd* que formen un sol operó, en aquest treball em estudiat per primera vegada l'organització transcripcional i la seva regulació en gens on la seva estructura es diferent i amb diferents promotors.

Agraïments

Vull agrair al Dr. M. P. Schmitt, Dr. J. Kalinowski i al Dr. B.J. Eikmanns el subministrament de diferents soques i plasmidis utilitzats en aquest estudi. També vull donar gràcies a la Dra. B.M. Sjöberg per les discussions dutes a terme en el transcurs d'aquest projecte.

Bibliografia

- Collins, M.D. (1987). Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. Nov. *Inter. J. System. Bacteriol.* 37, 442-443.
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W. i Sahm, H. (1991). A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102, 93-98.
- Fieschi, F., Torrents, E., Touloukhouva, L., Jordan, A., Hellman, U., Barbe, J., Gibert, I., Karsson, M., Sjöberg, B.M. (1998). The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. *J. Biol. Chem.* 273, 4329-4337.
- Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I. i Barbe, J. (1996b). Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* 19, 777-790.
- Jordan, A., Åslund, F., Pontis, E., Reichard, P. i Holmgren, A. (1997). Characterization of *Escherichia coli* NrdH. A glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J. Biol. Chem.* 272, 18044-18050.
- Jordan, A. i Reichard, P. (1998). Ribonucleotide reductases. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 71-98.
- Harder, J. (1993). Ribonucleotide reductases and their occurrence in microorganisms: a link to the RNA/DNA transition. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 273-292.
- Haydon, D.J., Guest, J.R. (1991). A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 291-296.

- Hill, P.J., Cockayne, A., Landers, P., Morrissey, J.A., Sims, C.M., Williams, P. (1998). SirR, a novel Iron-Dependent Repressor in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66, 4123-4129.
- Huque, Y., Fieschi, F., Torrents, E., Gibert, I., Eliasson, R., Reichard, P., Sahlin, M., Sjöberg, B.M. (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.
- Hutchinson III, C.A., Peterson, S.N., *et al.* (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science.* 286, 2165-2169.
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.J., Holmgren, A. i Pueyo, C. (2001). Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* En premsa.
- Posey, J.E., Hardham, J.M., Norris, S.J., Gherardini, F.C. (1999). Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 10887-10892.
- Reichard, P. (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases?. *Science.* 260, 1773-1777.
- Reichard, P. (1997) The evolution of ribonucleotide reduction. *Tibs* 22, 81-85.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N.Y.
- Schmitt, M.P., Predich, M., Doukhan, L., Smith, I., Holmes, R.K. (1995). Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect. Immun.* 63, 4284-4289.
- Schmitt, M.P. (1997). Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae hmuO* gene is regulated by iron and heme. *Infect. Immun.* 65, 4634-4641.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. i Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* pK18 and pK19: selection of defined deletion in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145, 69-73.
- Stojiljkovic, I., Bäumlner, A.J. i Hantke, K. (1994). Fur regulon in Gram-negative bacteria. Identification and characterization of new Iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* 236, 531-545.
- Thompson, J.D. (1997). The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Torrents, E., Jordan, A., Karlsson, M. i Gibert, I. (2000). Occurrence of multiple ribonucleotide reductase classes in gamma-proteobacteria species. *Curr. Microbiol.* 41,346-351.
- Willing, A., Follmann, H. i Auling, G. (1988). Ribonucleotide reductase of *Brevibacterium ammoniagenes* is a manganese enzyme. *Eur. J. Biochem.* 170, 603-611.

7. Agraïments

Crec que fer aquest apartat és una de les parts més difícils a l'hora d'escriure una Tesi, ja que segurament no queda reflectit tot el que voldria explicar o agrair. Malgrat crec que em poden arribar a sortir 5 fulls ... intentaré no deixar-me a ningú.

En primer lloc agrair a l'Isidre el suport continu que ha demostrat al llarg de tot el període de Tesi, tant en el treball com en totes les situacions personals. Suposo que les circumstàncies han estat una mica especials i atípiques degut a tot el viscut en el departament, que han comportat: redactar i començar projectes nous imprescindibles per a iniciant-se com a grup totalment independent, muntar un laboratori des de zero, i el patiment de trasllats, obres i reorganitzacions dins el laboratori. Tot això ha suposat que l'Isidre no sigui tant sols el meu director de Tesi sinó una persona a la que he d'agrair moltes altres coses.

L'altra persona a la que voldria agrair profundament tot el que ha fet és a l'Albert, l'altre director de Tesi. Ell ha estat qui em va introduir en el món de les RNR, tant des del punt de vista teòric com experimental, tant a Suècia com a Barcelona. Voldria agrair-li tot el que he après d'això que s'anomena ciència; stress, disseny d'experiments, simplicitat de les coses, perdre la por davant els "capos" de les RNR, i per moltíssimes ... moltíssimes coses més.

Així mateix, agrair als companys i amics dels primers anys de Tesi que m'han ajudat durant tot aquest temps, i amb els que vaig compartir i comparteixo tantes hores de convivència i moments entranyables. La primera vegada que vaig trepitjar un laboratori la Berta em va ensenyar, em va integrar i cuidar al laboratori, ... no t'oblidaré mai!. Al Sebi per orientar-me i ajudar-me en temps difícils, al Juanma per ser un pou de saviesa, al Chapi que és com el vi, millora amb els anys, al Xavi per les seves converses intel·lectuals, a l'Eva per la seva alegria i per les seves idees tant clares, al Calin per totes les festes viscudes, a l'Eugeni per la seva alegria, al Sebas per tenir el cap tant centrat i ser un bon conseller, al Joan per la seva "química", a l'Esther Oriol per suportar la meua música i els ajuts en els Southernns i altres coses, a l'Anna pels seus ajuts en les PCRs, a la Nathalie la bretona més divertida, a la Laura i al Rodri per les immersions i el superar les dificultats sota el mar, als d'ecologia microbiana: l'Olga, l'Emili i el Francesc, i els de la "vieja glòria" que he conegut fora del laboratori: la Maria, la Glòria i el Pere.

També tinc agraïments sincers als companys de laboratori d'aquests últims anys. La primera que va venir va ser la Irma, ja veus com va ser el nostre primerencontre: un curs molt, però que molt accelerat de Southern-Blot. Agrair-li la seva simpatia, la seva generositat i la seva fortalesa en situacions molt adverses, pensa que encara et queda pendent presentar-me a l'enanito !!. El segon a incorporar-se va ser l'Ignasi, la veritat és que al principi em vas fer patir de debò, entre que no t'entenia i que posaves en dubte absolutament tot el que t'ensenyava, en definitiva em portaves de bòlit ... però bé, sens cap dubte, ara no té res a veure amb aquells primers mesos, i t'he d'agrair el teu ajut en el laboratori i l'ànim per a començar coses noves. A tots dos gràcies per la vostra paciència, per l'ajut incondicional en el laboratori, per la lectura rigorosa d'aquesta Tesi i, en definitiva, per la vostra amistat.

En el segon any de Tesi per afers que mai entendré, em vaig trobar que l'equipament que disposava al laboratori es va reduir a un joc de micropipetes, un bany, un vòrtex, una estufa i com a reactius un litre de LB i unes deu plaques de Petri. En aquest punt cada vegada que entrava al "laboratori" em replantejava moltes coses, sobretot el continuar o no.

És en aquest punt quan te n'adones de la quantitat de gent que està disposada a ajudar-te amb generositat, posant al teu abast tot el que tenen. Així vull agrair al Jordi Cairó i a tot el seu grup del Departament d'Enginyeria Química per poder fer els gels de poliacrilamida, les lligacions, pel sumistrament de productes químics, etc; al Paquito d'Antropologia per l'ús de la PCR, el -80° , i la balança, i pel seu satirisme; a la Paqui de Fisiologia animal per la cubeta d'electroforesi i per moltes coses més; al Toni Villaverde de l'IBF (ara IBB) i a tot el seu grup (el Pepe Luis, el Jordi Feliu, el Xavi Carbo, l'Esther Ramírez, a la Mar, a l'Anna i al Dani, per tot el que vaig poder fer en el seu laboratori, pels consells a l'hora de fer els anticossos policlonals, pels Westerns, pels reactius químics i pel seu acolliment incondicional i desinteressat; al Josep Villanueva i a la Júlia del grup del Xavier Avilés; al Xavi Serra, l'Andrés i al Jaume Piñol del grup de l'Enrique Querol ambdós de l'IBF/IBB; a la Unitat de Genètica per les balances, pel -80°C , per la PCR, per la centrifuga i pel seu suport; i, finalment a la Marina Luquin i a tot el seu grup (a l'Esther, al Manolo, al Pep i a la Mercè) que ens van donar la primera bossa de puntes blaves, per tots els dinars junts i per un munt de coses més.

Al Francisco i al Patrick per l'ajut en l'estudi evolutiu de les RNR.

A la Virginia per la seva saviesa, per la seva comprensió, per la seva simpatia i pel seu esforç a l'hora de mantenir viu el treball i caliu al laboratori. A les secretes del departament: la Conchi, la Júlia, i a la bidell més espavilada, l'Elisa.

Des de fa cinc anys els viatges al laboratori del Dr. Peter Reichard al Karolinska Institut de Suècia han estat continus, això sí a l'ESTIU. Aquest apartat el considero molt important ja que m'ha permès conèixer i gaudir de l'activitat científica fora de l'Autònoma.

I would like to thank Peter Reichard, for sharing your enthusiasm in the RNR word, for your guidance not only in science, for teaching me all I know of protein purification and RNR knowledge, for your patience in my English, for your “*any problem*” every morning, and for a lot a lot of things that it is impossible to express in my English. Without any doubt I consider you one of the supervisors of this Thesis. I would like to thank you Vera Bianchi for hear my RNR meeting talks and for the slide English corrections. Both of them thanks for your dinners, lunches and take care of me in Sweden.

I would also like to thank Rolf Eliasson, for teaching me all the techniques in the lab, for taught me how to run RNR assays in the right way, for your “*good boy*” and “*this is life*”. I remember the first time I learn to run an anaerobic assay that it was around five o'clock in the morning ... to early. Together with Eva thanks to take care of me, and good luck in your new situation together with your family.

I also wish to thank:

Britte-Marie Sjöberg (Stockholm University) for your collaboration in the *C. ammoniagenes* project and for all the scientific discussions. Astrid Gräslund and Aimin Liu and Henriette Wolpher (Stockholm University) for your collaboration in the *L. lactis* project.

I would like to thank the advice of all the people from the RNR meetings, Marc Fontecave (Joseph Fourier University), Pär Nordlund and Derek Logan (Stockholm University), Lars Thelander (Umeå University) and Hans Eklund (Uppsala University).

Grant McClarty (Manitoba University) for the advice how to solve the structure of the *C. ammoniagenes nrd* region.

Chiara and Chinzia for the good time in the Peter Lab and meetings, and many thanks to Yasmin Huque, Monika Ekberg, Yessica Andersson, Frank Fieschi, Frederik Åslund for the not scientific discussions and for the good time.

Tambien agradecer a toda la Spanish-people que han estado o estan en Estocolmo por la ayuda recibida y por las innumerables fiestas. En especial a Antonio Miranda-Vizuette por ayudarme en los primeros años en Estocolmo fuera del laboratorio, por el entusiasmo sobre las tioredoxinas, por su generosidad y por su “*hola maricón*”. Y hacer extensible estos agradecimientos a Cristina, Alfonso, Cristian, Cesar, Eva, Jordi, Angela y José, Jose Rafa y Consuelo, Angel, Guille y Amilka.

A la Generalitat de Catalunya (CIRIT), la EMBO (European Molecular Biology Organisation), la FEBS (Federation of European Biochemistry Societies), la Fundació Margit and Folke Pehrson, pel suport econòmic durant la realització d'aquesta Tesi i per les estades de curta durada a Suècia i al Ganivet de Llengua Catalana de la UAB per la correcció d'aquesta tesi.

No voldria oblidar-me d'altra gent que també m'han ajudat en la realització d'aquest treball no en la part científica sinó en la personal, com els companys i amics de la carrera, de festes i de viatges. Agrair al Xavi Serra, a l'Andrés i la Mónica, a la Teresa “la Vasca”; als de Badalona inclosos el Simón, la Bárbara, el Max i la Joana; als de Cubla; a la Laia, la Cinta, la Celia, al Chus i al Raúl; al César, Grego, Jose, Juan Ramón i al David de Terrassa, i en especial al David “Carrito” per moltíssimes coses viscudes des de fa molt de temps, per les cerveses, per les festes, pel seu entusiasme, per la seva amistat i sobretot per ser una de les més bones persones que mai he conegut: suerte en tu tesis ...

Als companys de Biokit per l'interès continu que han mostrat quan estava escrivint aquesta Tesi.

A Hans Zimmer, Lito Vitale, Basil Poledouris, Clannad, Enya, Loreena Mckennit, James Horner, Phil Sawyer, Karl Jenkins, Nightnoise, Jerry Goldsmith, i al Ramón Trecet per alegrar-me i endolcir la meva vida.

Per anar acabant, agrair profundament tot i més a la meva mare per el seu suport, la seva estima i com sempre diré, és de les poquíssimes persones que m'ha entès i m'ha recolzat en totes les coses que he anat fent tots aquests anys. Agrair al Pedro l'entusiasme que transmet a l'hora de fer coses noves i sobretot per estar en el lloc on és.

Per últim agrair a l'Esther, el suport que m'ha donat tots aquests anys, pels seus consells, per la paciència i patiment que ha tingut cada vegada que marxava fora, per

l'amor que demostra contínuament, per l'alegria que desprèn, per tot això i molt, molt, molt, molt més vull dedicar-te aquesta Tesi.

Be al final sols han estat 5 els fulls. Sens dubte t'he n'adones la quantitat de persones que t'han ajudat a dur a terme aquesta MAGNA feina. Espero no haver-me oblidat a ningú, que no m'estranyaria !!!!!.