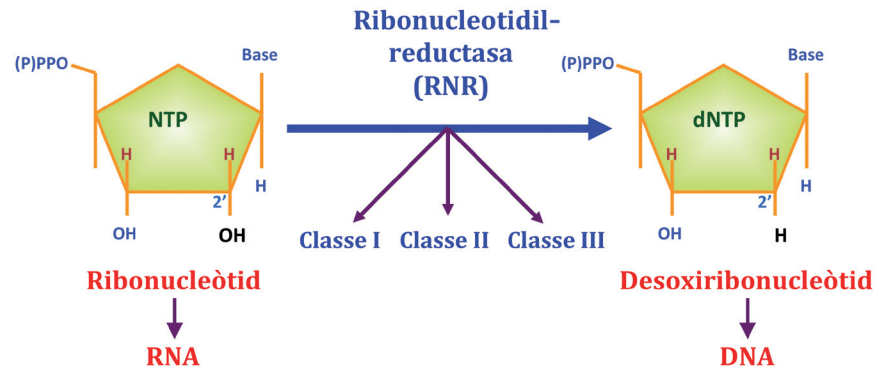


Maria del Mar Cendra Gascón i Eduard Torrents Serra. Grup d'infeccions Bacterianes: Teràpies Antimicrobianes, Institut de Bioenginyeria de Catalunya (EC)

Les **ribonucleòtid-reductases (RNR)** són enzims essencials per a tota cèl·lula, perquè fan la transformació dels ribonucleòtids a desoxiribonucleòtids, els quals són necessaris per a la síntesi de l'àcid desoxiribonucleic (DNA). És evident que les RNR són enzims ancestrals i clau en l'evolució del material genètic que hi ha actualment, i són essencials per a l'evolució de tots els organismes que hi ha sobre la Terra. A causa de l'essencialitat de la reacció que fan aquests enzims, es poden considerar una diana ideal per al disseny de compostos que inhibeixen la replicació cel·lular, ja sigui en cèl·lules eucariòtiques (incloent-hi cèl·lules cancerígenes), com agents bacterians infecciosos.

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

Un primer requisit per a la síntesi del DNA és el subministrament equilibrat de desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTP). L'única via per a la síntesi *de novo* de dNTP és la reacció catalitzada per l'enzim ribonucleòtid-reductasa (RNR), que converteix els ribonucleòtids (NTP) en els seus corresponents desoxi-



ribonucleòtids trifosfat (dNTP), eliminant el grup 2'-hidroxil i substituint-lo per un hidrogen (vegeu la figura 1).

Estructura i mecanismes

Per reduir cada ribonucleòtid la ribonucleòtid-reductasa (RNR) genera un radical proteic encarregat de donar el poder reductor necessari per catalitzar la reacció. La manera com l'enzim genera aquest radical, el tipus de cofactor, el metall requerit, l'estructura tridimensional i la dependència de l'oxigen, són peculiaritats que es tenen en compte a l'hora de classificar les RNR. Fins al moment s'han descrit tres classes de RNR: classe I (subdividida en Ia, Ib i Ic), II i III (vegeu la taula 1). Totes tres classes conserven una estructura proteica tridimensional en forma de barril α/β amb una alta homologia on es localitzen el centre catalític de l'enzim i els centres de regulació al·lostèrica.

Un únic centre actiu ha de reduir els quatre ribonucleòtids; per tant, els nivells dels quatre desoxiribonucleòtids han d'estar fortament regulats perquè no s'introdueixin mutacions durant la replicació o reparació del DNA. Per això una de les característiques més particulars de les RNR és la seva regulació al·lostèrica. Aquesta regulació es du a terme a dos nivells diferents: un a escala d'especificitat de substrat, en què la unió de diferents nucleòtids donarà lloc a la reducció específica de cadascun dels ribonucleò-

↑ Figura 1. Esquema de la reducció dels ribonucleòtids a desoxiribonucleòtids.

tids en el centre actiu; i, un segon, que regula l'activitat general de l'enzim on la unió de dATP o ATP l'activarà o l'inhibirà, respectivament (vegeu la figura 2).

Classe I

La ribonucleòtid-reductasa (RNR) de classe I és la més coneguda i estudiada. L'enzim el componen dues subunitats homodimèriques anomenades α i β . La subunitat α és la subunitat catalítica, conté el centre actiu on es du a terme la catàlisi i també dos llocs de regulació al·lostèrica, el d'especificitat de substrat i el d'activitat.

Per la seva part, la subunitat β conté el centre metàl·lic on s'origina el radical proteic necessari per dur a terme la catàlisi. El tipus de centre metàl·lic que posseeix l'enzim és una de les característiques que es tenen en compte a l'hora de subdividir la classe I en Ia, Ib i, més recentment, Ic (vegeu les característiques en la taula 1).

Classe II

La RNR de classe II consta únicament d'una cadena α -polipeptídica codificada en el genoma pel gen *nrdJ*. En aquesta proteïna NrdJ és on es troba el centre actiu de l'enzim i també els llocs al·lostèrics. A diferència de la classe I, l'enzim no requereix oxigen sinó S-adenosilcobalamina (AdoCob), cosa que

fa que sigui una classe completament independent a l'oxigen.

Classe III

La RNR de classe III la componen dues proteïnes dimèriques codificades en el genoma per l'operó *nrdDG*. *NrdD* és la subunitat gran i catalítica de l'enzim, on hi ha el centre actiu i també els dos llocs de regulació allostèrica. Per altra banda, la proteïna *NrdG* (coneguda com a *activasa*) és necessària per dur a terme l'activitat enzimàtica. Aquesta classe de RNR és extremadament sensible a l'oxigen i sols es troba confinada en organismes que poden créixer en condicions d'anaerobiosi.

Regulació genètica

Una alteració en les concentracions dels diferents desoxiribonucleòtids donaria lloc a un increment de la freqüència de mutació durant la replicació del DNA, conseqüència fatal per a la viabilitat d'un organisme. És per això que l'activitat de les ribonucleòtid-reductases ha d'estar fortament regulada, ja sigui amb la regulació allostèrica de la proteïna, descrita anteriorment, o regulant-ne la transcripció.

La transcripció de la majoria de les ribonucleòtid-reductases, tant de bacteris com de cèl·lules eucariòtiques, està regulada pel cicle cel·lular, ja que és principalment durant la divisió cel·lular quan es dona la replicació del DNA i on es requereixen elevades concentracions de desoxiribonucleòtids.

La transcripció es complica en organismes que codifiquen més d'una classe de RNR en el seu genoma, principalment microorganismes, ja que esdevé essencial assolir una bona coordinació en la regulació de l'expressió dels diferents gens per garantir una concentració adient de cada enzim i proporcionar així uns nivells equilibrats dels dNTP. Per exemple, *Escherichia coli* utilitza la RNR de classe Ia per al creixement en condicions de laboratori, la classe III quan creix en anaerobiosi, i recentment s'ha observat que la classe Ib és important quan aquesta forma

biofilms. Per altra banda, *Pseudomonas aeruginosa* també utilitza la RNR de classe Ia per al creixement en condicions de laboratori i les RNR de classe II i III sota condicions de creixement en biofilm o durant el procés d'infecció. Diferents factors transcripcionals estan involucrats a expressar i a inhibir cada classe segons la condició ambiental de creixement en la qual es troba el bacteri (vegeu la bibliografia per ampliar detalls).

Evolució

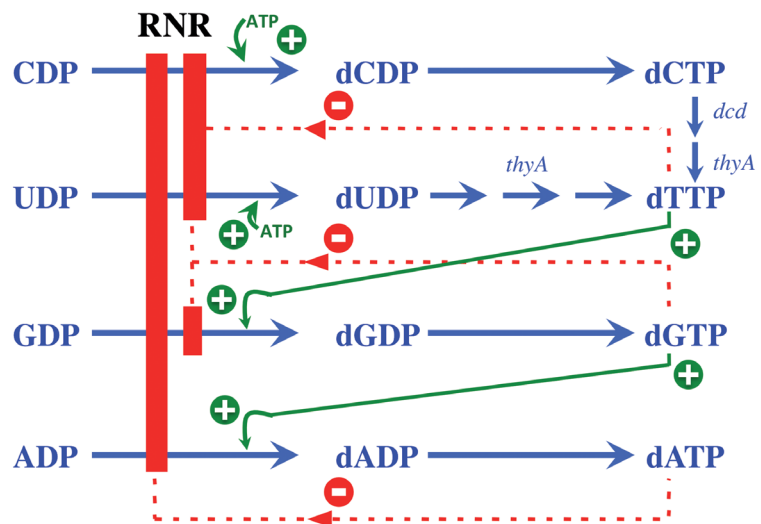
El manteniment de la vida sobre la Terra depèn de la capacitat que té aquesta per reproduir-se a si mateixa. Per a això cal un emmagatzematge estable i acurat de tota la informació genètica d'un organisme. Ara com ara, hi ha forts arguments a favor de considerar l'RNA com a molècula primordial amb activitat autoreplicativa. Tant les molècules de DNA com de RNA contenen la informació per duplicar-se a si mateixes, a partir de l'aparellament de bases complementàries; i ambdues molècules necessiten una maquinària proteica (DNA i RNA-polimerases) per dur a terme aquesta duplicació. La concepció d'un món de RNA, però, tot i estar àmpliament acceptada, també té els seus detractors, i els arguments en contra no s'han de menystenir.

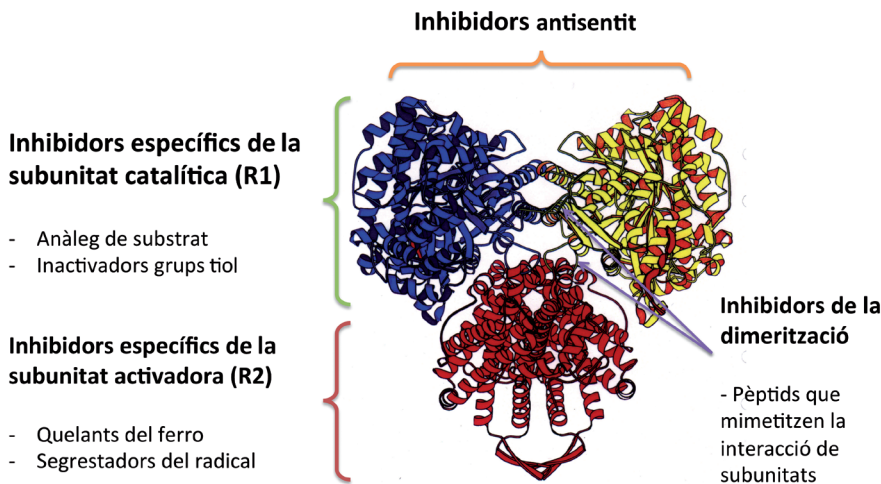
La transició des d'un món de RNA a un de

proteïna-DNA implicaria l'existència d'una traducció basada en ribosomes, la qual cosa suposaria l'establiment d'un codi genètic i la substitució de l'RNA pel DNA com a material genètic. L'estudi de les RNR actuals junt amb el coneixement de l'evolució dels organismes sobre la Terra ens pot ajudar a determinar el tipus d'enzim més semblant a la RNR ancestral i això comportaria una millor comprensió de la transició del món de RNA al de DNA.

Actualment coneixem tres classes de ribonucleòtid-reductases diferents, aparentment amb poca similitud entre si a escala d'estructura primària, per la qual cosa podríem pensar que cada una ha aparegut independentment de les altres. Però, sorprenentment, hi ha una gran similitud quant al seu mecanisme de reacció, regulació allostèrica

↓ **Figura 2.** Regulació allostèrica de les ribonucleòtid-reductases. Model de regulació allostèrica de la RNR de classe Ia. La unió de l'ATP en el lloc d'especificitat de substrat induïx l'activitat general de l'enzim i promou la reducció del CDP i de l'UDP a dCDP i dUDP, respectivament. Una vegada format el dTTP promou la reducció del GDP a dGDP que, al mateix temps, induïx la reducció de l'ATP a dATP. L'elevada concentració de dATP format inhibeix l'activitat general de l'enzim unint-se al lloc allostèric d'activitat.





← Figura 3. Model d'acció dels diferents inhibidors de les ribonucleòtid-reductases.

codifiquen la RNR de classe Ia, i això limita el nostre rang ambiental de supervivència i ens restringeix a l'ambient aeròbic.

En la taula 2 es pot veure un exemple de la distribució que presenten els eucariotes, arqueus i bacteris. Així, trobem bacteris que codifiquen una sola RNR, com és el cas de *Bacillus subtilis*; o bé un grau de complexitat elevada com en *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica les tres classes diferents de RNR (classe Ia, II i III).

Hem participat en el desenvolupament d'una pàgina web on hi ha tota la informació de la distribució de les RNR en tots els organismes que es pot consultar lliurement (<http://rnrdm.molbio.su.se>).

Les ribonucleòtid-reductases com a dianes biomèdiques

Les ribonucleòtid-reductases són enzims essencials per a tots els organismes, ja que proporcionen els desoxiribonucleòtids necessaris per a la replicació dels cromosomes de totes les cèl·lules eucariòtiques i procariòtiques, com també la reparació d'aquests després de produir-se danys en el DNA. Aquesta essencialitat fa que aquest enzims siguin una diana perfecta per al disseny de compostos que inhibeixen el creixement cel·lular, ja sigui en cèl·lules amb alteracions del cicle cel·lular (cèl·lules cancerígenes) o bé durant la infecció causada per un virus, bacteri o protozou.

i, sobretot, semblança en la seva estructura terciària, que certifiquen un possible origen comú per a totes.

Hem de considerar que les primeres etapes de la vida sobre la Terra es van donar en un ambient anaeròbic estricte; per tant, i resumint el procés evolutiu que hi ha hagut en l'evolució de les RNR que trobem actualment, es creu que la RNR ancestral (uracil-reductasa) s'assemblaria més a la RNR de classe III que trobem actualment i que, per divergència evolutiva, va donar lloc a la classe II. La classe II també va evolucionar per donar lloc a les tres classes I existents. Certament, l'aparició de l'oxigen sobre la Terra va ser el punt clau que va impulsar aquest pro-

↓ Taula 1. Resum de les característiques diferencials de les tres classes de ribonucleòtid-reductases

cés evolutiu, que va culminar amb l'aparició de les diferents classes de RNR que trobem actualment.

Distribució

Un fet sorprenent en aquesta família d'enzims és la distribució que presenten les diferents classes de RNR. Per una banda, la distribució de RNR que presenten els microorganismes és molt complexa, ja que podem trobar qualsevol combinació de les diferents RNR en un mateix genoma. La seqüenciació d'un gran nombre de microorganismes ha posat de manifest que, sorprenentment, diverses classes, en principi totalment redundants de RNR, estan codificades en un mateix microorganisme i fins i tot els tres tipus, i això confereix així un gran avantatge per sobreviure en diferents condicions ambientals. Per altra banda, els organismes eucariòtics, aparentment més complexos, només

	Classe Ia	Classe Ib	Classe Ic	Classe II	Classe III
Dependència oxigen	Aeròbica	Aeròbica	Aeròbica	Aeròbica/anaeròbica	Anaeròbica
Estructura	a ₂ b ₂ /a ₆ b ₆	a ₂ b ₂	a ₂ b ₂	a(a ₂)	a ₂ +b ₂
Gens	<i>nrdAB</i>	<i>nrdHIEF</i>	<i>nrdAB</i>	<i>nrdJ</i>	<i>nrdDG</i>
Radical	Tyr...Cys	Tyr...Cys	Phe...Cys	AdB12...Cys	AdoMet...Gly...Cys?
Centre metàl·lic	Fe ^{III} -O-Fe ^{III}	Mn ^{III} -O-Mn ^{III} Fe ^{III} -O-Fe ^{III}	Mn ^{IV} -O-Fe ^{III}	Co	Fe ^{II} -S ^{II}
Substrat	NDP	NDP	NDP	NDP/NTP	NTP
Reductant	Tioredoxina Glutaredoxina	NrdH-redoxina Glutaredoxina	Tioredoxina Glutaredoxina	Tioredoxina	Format
Llocs al·lostèrics	2	1	2	1/2	2
Inhibició ATP	Sí	No	Sí	No/Sí	Sí
Distribució	Eucariotes, eubacteris Bacteriòfags Virus	Eubacteris	Arqueobacteris Eubacteris	Arqueobacteris Eubacteris Bacteriòfags	Arqueobacteris Eubacteris Bacteriòfags

Eucariotes

<i>Homo sapiens</i> (home)	Ia
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> (llevat)	Ia
<i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)	Ia

Arqueobacteris

<i>Pyrococcus furiosus</i>		II	III
<i>Sulfolobus islandicus</i>		II	
<i>Natromonas pharaonis</i>	Ia	II	

Eubacteris

<i>Bacillus subtilis</i>		Ib	
<i>Bacillus anthracis</i>		Ib	III
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ia		III
<i>Clostridium tetani</i>			II III
<i>Lactobacillus casei</i>		Ib	II III
<i>Staphylococcus aureus</i>		Ib	III
<i>Mycoplasma mobile</i>			II
<i>Actinomyces urogenitalis</i>		Ib	III
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		Ib	II
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			II III
<i>Nostoc azollae</i>			II
<i>Escherichia coli</i>	Ia	Ib	III
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ia		II III
<i>Vibrio cholerae</i>	Ia		III
<i>Salmonella enterica</i>	Ia	Ib	III
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ia		II III
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Ia		II
<i>Chamydia trachomatis</i>			Ic
<i>Tropheryma whipplei</i>			Ic

Informació extreta de <http://rnrdp.molbio.su.se>

→ **Taula 2.** Distribució resumida de les ribonucleòtid-reductases en els tres dominis de la vida

Ja que aquests enzims són molt complexos, avui dia s'han descrit diferents inhibidors d'aquest enzim que es poden classificar segons el seu model d'acció (vegeu la figura 3). El primer grup d'inhibidors interactuen directament en la subunitat catalítica (α), on alteren la seva activitat enzimàtica, ja sigui per la unió irreversible al centre actiu de l'enzim (anàlegs de substrat o inactivadors del grup tiol) o bé per la unió al centres allostèrics d'aquests. En el segon grup trobem els que interaccionen amb la subunitat activadora (β) de les RNR de classe I, ja sigui per agents quelants del ferro del centre dinuclear o bé com a segrestadors del radical tirosil necessari per a la reducció dels NTP. El tercer grup comprèn els inhibidors antisentit, que són RNA antisentit que s'uneixen a l'mRNA que codifica els components d'aquest enzim. S'estan obtenint resultats prometedors per al tractament d'alguns càncers. Finalment tenim els inhibidors que eviten la dimerització dels components d'aquest enzim, que bàsicament són pèptids que mimetitzen la interacció entre la subunitat catalítica (α) i la subunitat activadora (β). •

Bibliografia

- CENDRA, M. M. [et al.] (2012). «Biofilm modifies expression of ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*». *PLoS ONE*, 7 (9): e46350.
- HOFER, A. [et al.] (2010). «DNA Building blocks: keeping control of manufacture». *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 47: 50-63.
- LUNDIN, D. [et al.] (2010). «Ribonucleotide reduction - horizontal transfer of a required function spans all three domains». *BMC Evolutionary Biology*, 10: 383.
- REICHARD, P. (1997). «The evolution of ribonucleotide reduction». *Tibs*, 22: 81-85.
- SJÖBERG, B. M. (2010). «A never-ending story». *Science*, 329: 1475-1476.
- (2011). «Shift in ribonucleotide reductase gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* during infection». *Infection and Immunity*, 79: 2663-2669.
- TORRENTS, E. [et al.] (2002). «Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme». *J. Mol. Evol.*, 54: 138-152.
- (2005). «Efficient growth inhibition of *Bacillus anthracis* by know out the ribonucleotide reductase tyrosil radical». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 17946-17951.
- (2007). «NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes». *Journal Bacteriology*, 189: 5012-5021.
- (2008). «The Ribonucleotide Reductase Family- Genetics and Genomics». A: *Ribonucleotide Reductases. Molecular Anatomy and Physiology of Proteins*. Nova Science Publishers, Inc.



Eduard Torrents (Tarragona, 1972) és llicenciat en ciències biològiques per la Universitat Autònoma de Barcelona (1996) i va obtenir el grau de doctor el 2001. Després de cinc anys a la Universitat d'Estocolm, s'incorpora a l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya - IBEC (2007), on lidera des de 2012 el grup d'infeccions bacterianes: teràpies antimicrobianes. Concretament el seu camp d'interès són els mecanismes de replicació bacteriana, la seva relació en patogènia i el desenvolupament de noves eines antimicrobianes basades en la inhibició dels enzims responsables de la síntesi del DNA bacterià.



Maria del Mar Cendra (Vilanova i la Geltrú, 1985) és llicenciada en biologia per la Universitat de Barcelona (2008) i posseeix el títol de màster en microbiologia avançada de la Universitat de Barcelona (2009). Actualment es troba elaborant la tesi doctoral a l'Institut de Bioenginyeria de Catalunya (IBEC) en el grup d'infeccions bacterianes: teràpies antimicrobianes, dirigit per Eduard Torrents.