

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA

Programa de Doctorado

Bioquímica y Biología Molecular y Genética

(Bienio 2001-2003)

MEMORIA DE INVESTIGACIÓN

presentada para optar al

Diploma de Estudios Avanzados

en el área de conocimiento de

Bioquímica y Biología Molecular

por

ISABEL MARIA SIMÃO ALVES PEREIRA FERREIRA

Badajoz, octubre de 2004

RESUMEN

Este trabajo de investigación forma parte de una línea más amplia dedicada a la identificación y caracterización de nucleósido-difosfato-X (NDP-X) hidrolasas de diversas fuentes biológicas, principalmente humanas y bacterianas. El objetivo concreto de este trabajo ha sido la caracterización de una enzima con actividad de CDP-X hidrolasa detectada en cultivos puros de *Yersinia intermedia*, preparados a partir de un aislado bacteriano obtenido de un extracto de pulmón de rata [Martín-Cordero, P. (2002) Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura].

La actividad CDP-X hidrolasa (medida con CDP-etanolamina como sustrato) se purificó parcialmente a partir del medio extracelular de suspensiones de *Y. intermedia*, por cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico. La enzima se caracterizó molecularmente en cuanto a su peso molecular (52000) y su punto isoelectrónico (6,5). Se estudió su especificidad de sustrato y de reacción, encontrándose que se trata de una NDP-X hidrolasa con preferencia por sustratos CDP-X, particularmente CDP-glicerol y CDP-etanolamina, y de forma menos marcada por derivados UDP-azúcar. Además de la actividad NDP-X hidrolasa, la preparación enzimática resultó ser muy activa también sobre los nucleótidos AMP y CMP y sus homólogos difosforilados (CDP, ADP) y trifosforilados (ATP). Se estudió la naturaleza de los productos de reacción con CDP-glicerol, CDP-etanolamina, CDP-colina, UDP-glucosa, CDP, CMP y AMP. Los resultados indicaron que en todos los casos resultan hidrolizadas las uniones 5'-fosfoéster, entre la base y el primer fosfato, y fosfoanhídrido, entre los dos fosfatos (salvo en el caso particular del CMP y AMP, que no puede sufrir esta última reacción). Se estudió la cinética de saturación, determinando valores de K_m para varios sustratos, que ofrecieron resultados similares. Se estudió también el efecto de variaciones de pH y de cationes divalentes sobre la actividad enzimática.

Los resultados del estudio realizado indican que la CDP-X hidrolasa de *Y. intermedia* puede ser una 5'-nucleotidasa / NDP-X hidrolasa similar a la conocida en *Escherichia coli* como 5'-nucleotidasa / UDP-azúcar hidrolasa (codificada por el gen *ushA*). Sin embargo, respecto a lo que se conoce sobre la enzima de *E. coli*, la enzima aquí estudiada presenta la novedad de su actividad sobre algunos derivados CDP-X, superior a la que presenta sobre derivados UDP-X. Actualmente este estudio se está continuando con la caracterización de la 5'-nucleotidasa / UDP-azúcar hidrolasa de *E. coli*, a partir de cultivos normales de esta bacteria y de cultivos que sobreexpresan la enzima a partir de un plásmido portador del gen *ushA*.