

CNCSIS, Planul National PN II, Program « Idei », Proiecte de Cercetare Exploratorie

Proiect ID_1034

Titlul proiectului: **Rolul microbiotei archaeene in controlul obezitatii: enzime ale metabolismului argininei si pirimidinelor la *Methanobrevibacter smithii* cu potential reglator al asimilarii gastrointestinale**

Contract nr. 1023/2009

Director de proiect : Dr. Cristina Purcarea

VALOARE TOTALĂ contract : 1.000.000 lei

Valoare 2009: 91911,93 lei

Rezumat:

Contributia microorganismelor enterice la hidroliza si absorbtia diversilor nutrienti la nivelul tractului gastro-intestinal constituie un factor important in nutritie. recenta descoperire a rolului esential al metanogenului *Methanobrevibacter smithii*, principalul archaeon al microbiotei intestinale, in cresterea eficientei sistemului nostru digestiv prin influentarea procesului bacterian de hidroliza a polizaharidelor, a deschis calea unei noi metode de combatere a obezitatii prin manipularea contributiei *M. smithii* la procesele metabolice ale microbiotei enterice. Activitatea enzimelor-cheie implicate in asimilarea amoniacului in acest archaeon reprezinta un parametru metabolic esential in controlul procesului. În acest context, proiectul de fata isi propune caracterizarea structurala si functionala a unui sistem enzimatic complex implicat in asimilarea amoniacului la nivelul metabolismului argininei si nucleotidelor pirimidinice din *M. smithii*. acesta este compus din doua carbamoil fosfat sintetaze (cps) specifice celor doua cai metabolice in acest archaeon, reprezentand o potentiala tinta pentru manipularea supra-metabolismului microbial intestinal implicat in obezitate la om. obiectivele principale sunt (1) caracterizarea activitatii si reglarii alosterice ale cps native si recombinante, (2) studiul contributiei acestor cps la cele doua cai metabolice implicate in consumul de amoniac, si (3) identificarea unui mecanism de control al continutului microbial de *M. smithii* in microbiota intestinala la nivelul acestui sistem enzimatic. Etapele implicate cuprind cultivarea anaeroba a *M. smithii*, clonarea, exprimarea si purificarea subunitatilor cps si studii biochimice ale cps native si recombinante. acest studiu molecular va implica utilizarea metodelor de biologie moleculara, biochimie, microbiologie si bioinformatica, urmarind descifrarea mecanismelor de control al obezitatii la nivelul metabolismului microbiotei intestinale umane.

PLAN DE REALIZARE

An	Obiective	Activități
2009	1. Obținerea culturilor microbiene și a ADN archaean; analiza structurală a subunităților CPS din <i>M. smithii</i>	1.1. Cultivarea anaerobă a metanogenului <i>M. smithii</i> 1.2. Extractia ADN total din <i>M. smithii</i> 1.3. Analiza genomică a <i>M. smithii</i> și analiza secvențială a subunităților CPS constitutive
	2. Obținerea CPS recombinante din <i>M. smithii</i>	2.1. Clonarea subunităților CPS1 și CPS2 din <i>M. Smithii</i> 2.2. Expresia genică în <i>Escherichia coli</i> a subunităților CPS1 și CPS2 din <i>M. smithii</i>
2010		2.3. Purificarea subunităților proteice ale CPS1 și CPS2 și reconstituirea enzimelor recombinante
	3. Caracterizarea activității enzimatică a CPS1 și CPS2 native și recombinante din <i>M. smithii</i>	3.1. Studiul activității enzimatică CPS în extractele celulare de <i>M. smithii</i> 3.2. Caracterizarea activității enzimatică Gln-dependente și NH ₃ -dependente ale CPS1 și CPS2 recombinante 3.3. Determinarea contribuției CPS1 și CPS2 la sinteza argininei și nucleotidelor pirimidinice
	4. Determinarea proprietăților funcționale ale CPS1 și CPS2 recombinante cu potențial în reglarea metabolică a <i>M. smithii</i>	4.1. Studiul reglării alosterice a CPS1 și CPS2 4.2. Determinarea reacțiilor parțiale din mecanismul de reacție al CPS1 și CPS2
2011	5. Evaluarea rolului CPS în metabolizarea amoniacului în <i>M. smithii</i> ca potențială țintă în controlul creșterii acestui archaeon	5.1. Determinarea eficienței metabolizării amoniacului prin cele două cai metabolice ale CPS la <i>M. Smithii</i> 5.2. Determinarea dependenței <i>M. smithii</i> de activitatea CPS1 și CPS2 în metabolismul carbamoyl fosfatului

VALORIZAREA REZULTATELOR

2009

Articol publicat în revista cotate ISI:

- Popa E, Rusu A, Zamfir M, Dumitru L, Purcarea C (2009) An ammonia-metabolizing enzyme from the human archaeon *Methanobrevibacter smithii* might represent a missing link in the evolution of carbamoyl phosphate synthetases. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 23(2): 533-537

Postere prezentate la conferințe internaționale:

- FEMS 2009 3rd Congress of European Microbiologists, Gothenburg - Suedia, 28 iunie – 2 iulie 2009. Carbamoyl phosphate synthetase from the human gut archaeon *Methanobrevibacter smithii*, a putative target for obesity prevention. E. Popa, A. Rusu, C. Purcarea.

- XI Anniversary Scientific Conference “Biology-Traditions and Challenges”, Sofia – Bulgaria, 27-29 mai, 2009. An ammonium metabolizing enzyme from the human archaeon *Methanobrevibacter smithii* might represent a missing link in the evolution of carbamoyl phosphate synthetases E. Popa, A. Rusu, C. Purcarea.

Postere prezentate la Sesiunea Stiintifica a Institutului de Biologie Bucuresti, 10.12.2009

- Carbamoil fosfat sintetaza din archaeonul intestinal *Methanobrevibacter smithii*: clonare si expresie. Elena Popa, Andreea Rusu, Medana Zamfir, Cristina Purcarea;
- Carbamoil fosfat sintetaza din archaeonul uman *Methanobrevibacter smithii*: un potential intermediar in evolutia filogenetica a acestei clase de enzime. Elena Popa, Andreea Rusu, Cristina Purcarea;

Premieri

- ***Premiul I la sectiunea Biologie Moleculara.***
XI Anniversary Scientific Conference “Biology-Traditions and Challenges”, Sofia – Bulgaria, 27-29 mai, 2009. An ammonium metabolizing enzyme from the human archaeon *Methanobrevibacter smithii* might represent a missing link in the evolution of carbamoyl phosphate synthetases E. Popa, A. Rusu, C. Purcarea. *Poster*