

MGCTVSTQTIISKGEELFTGVVPIVLVDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLLKFICTTGKL
 PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
 FEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
 QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDDEL-
MeBSeq*,

unde cu maro este secvența semnal pentru miristoilare, cu verde este secvența proteinei verde fluorescente (GFP) și **MeBSeq** este secvența de aminoacizi cu afinitate pentru ioni metalici. Asteriscul este corespunde codonului STOP.

A1.1: Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys (din O1, para 1) - proces continuu

T1. Proiectare de primeri pentru introducerea MeBPep bogată în Cys: C6-C10, (CD)3-(CD)5, (CE)3-(CE)5. C = Cys = cisteină; D = Asp = aspartat; E = Glu = glutamat

Primer anti-sense	Secvența introdusă	Obs.
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys6	GTCGAC: situs SalI TCA codon STOP
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAAGCAACAATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys8	
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAAGCAACAATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys9	
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAAGCAACAAGCAACAATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys10	
AAGTCGAC TCA GCAATCGCAATCGCAATCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysAsp)3	
AAGTCGAC TCA GCAATCGCAATCGCAATCGCAATCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysAsp)4	
AAGTCGAC TCA GCAATCGCAATCGCAATCGCAATCGCAATCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysAsp)5	
AAGTCGAC TCA GCATTTCGCATTTCGCATTTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysGlu)3	
AAGTCGAC TCA GCATTTCGCATTTCGCATTTCGCATTTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysGlu)4	
AAGTCGAC TCA GCATTTCGCATTTCGCATTTCGCATTTCGCATTTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysGlu)5	

T2. Amplificarea PCR a myrGFP-MeBPep-(Cys-rich)

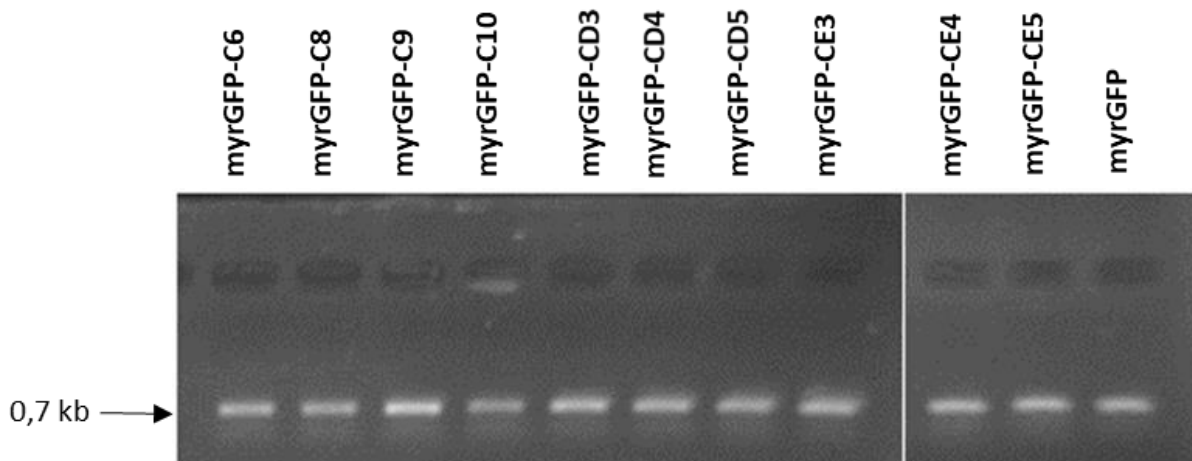


Fig. 2. Electroforegrama ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (Cys-rich) obținuți prin PCR.

T3. Clonarea ampliconilor obținuți în vectorul pGREG596 (www.euroscarf.de), care datorită secvenței de miristoilare la capătul N-terminal al ADN-ului pentru GFP permite exprimarea pe fața interioară a membranei plasmatică.

Ampliconii purificați (Wizard PCR clean up kit, Promega, USA) au fost incluși în vectorul pCRII prin procedul TA cloning (Thermo Fisher, Invitrogen) pentru subclonări ulterioare în vectori de interes.

În paralel, ampliconii purificați au fost clivați cu restrictazele *SpeI* și *SalI* și introduși în pGREG595 (între situsurile *SpeI* și *SalI*, concomitent cu eliminarea fragmentului myGFP din vector (Figura 3). Prin acest procedeu se înlocuiește fragmentul myrGFP cu myrGFP-MeBSeq, rezultând pGREG596Δ-myGFP-MeBSeq.

Au fost obținute clone pozitive pentru pGREG596Δ-myGFP-C6, pGREG596Δ-myGFP-C8, pGREG596Δ-myGFP-C9 și pGREG596Δ-myGFP-C10 (Figura 3), pGREG596Δ-myGFP-CE3, pGREG596Δ-myGFP-CE4. *În curs de desfășurare.*

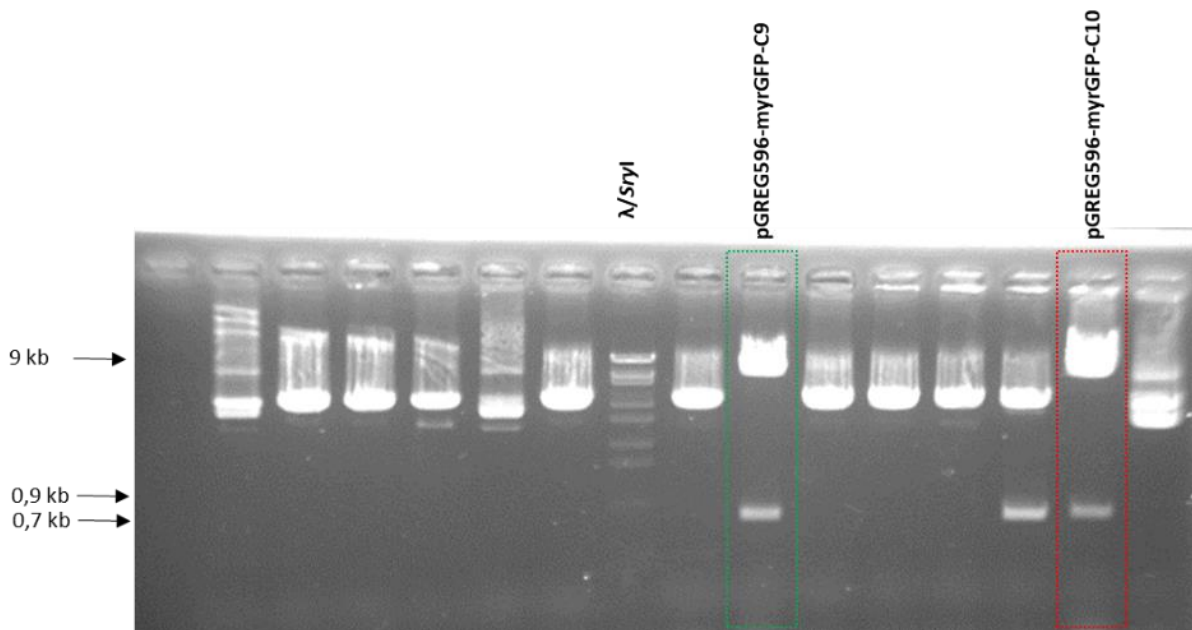


Fig. 3. Electroforegrama fragmentelor obținute la verificarea clonării corecte a ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq în pGREG596. Ampliconii și pGREG596 au fost clivați cu *SpeI* + *SalI*, fragmentele au fost ligate cu ADN ligaza, amestecul de ligare fiind utilizat pentru transformarea celulelor competente de *Escherichia coli*. Ulterior au fost izolate plasmidele din colonii ampicilin-rezistente, iar acestea au fost verificate pentru corectitudine prin re-clivare cu *SpeI* + *SalI*. Chenarele verde și roșu indică rezultatele pozitive.

T4. Transformarea liniei de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 cu constructele obținute.

Au fost obținuți transformanți pentru toate plasmidele pozitive. *În curs de desfășurare.*

A1.2: Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His (din O1, partea 1) - proces continuu

T1. Proiectare de primeri pentru introducerea MeBPep bogat în His: H6-H10, (HD)3-(HD)5, (HE)3-(HE)5. H = His = histidină; D = Asp = aspartat; E = Glu = glutamat

Primer anti-sense	Secvența introdusă	Obs.
AAGTCGAC TCA GTGATGGTGATGGTGATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	His6	GTCGAC: situs <i>SalI</i> TCA codon STOP
AAGTCGAC TCA GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	His8	
AAGTCGAC TCA GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	His9	
AAGTCGAC TCA GTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	His10	
AAGTCGAC TCA ATCGTGATCATGATCGTGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisAsp)3	
AAGTCGAC TCA ATCGTGATCATGATCGTGATCATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisAsp)4	
AAGTCGAC TCA ATCGTGATCATGATCGTGATCATGATCATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisAsp)5	
AAGTCGAC TCA TTCGTGTTTCATGTTTCGTGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisGlu)3	
AAGTCGAC TCA TTCGTGTTTCATGTTTCGTGTTTCATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisGlu)4	
AAGTCGAC TCA TTCGTGTTTCATGTTTCGTGTTTCATGTTTCGTGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisGlu)5	

T2. Amplificarea PCR a GFP-MeBPep (His-rich). (Figura 4)

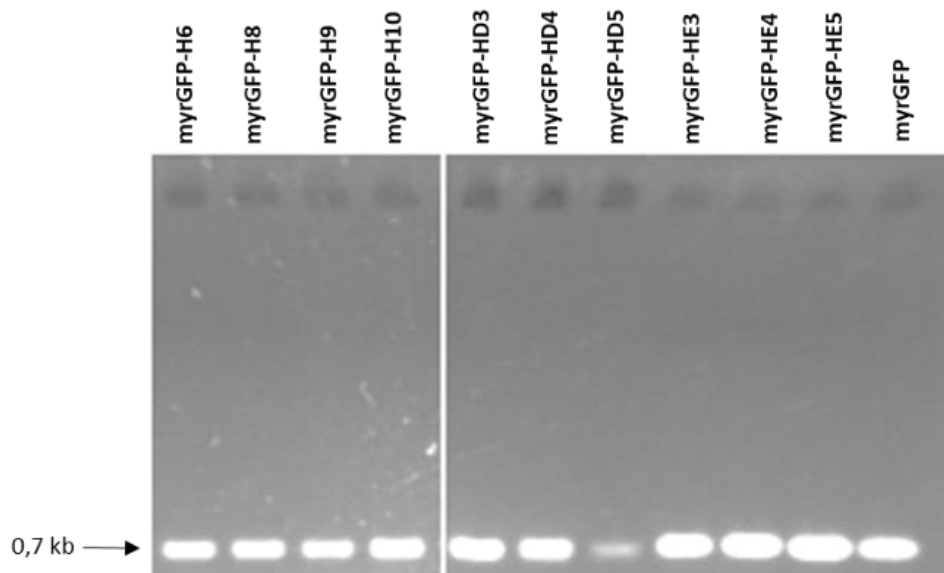


Fig. 4. Electroforegrama ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (His-rich) obținuți prin PCR.

T3. Clonarea ampliconilor obținuți în vectorul pGREG596, care datorită secvenței de miristoilare la capătul N-terminal al ADN-ului pentru GFP permite exprimarea pe fața interioară a membranei plasmatică.

Ampliconii purificați (Wizard PCR clean up kit, Promega, USA) au fost incluși în vectorul pCRII prin procedeul TA cloning (Thermo Fisher, Invitrogen) pentru subclonări ulterioare în vectori de interes.

În paralel, ampliconii purificați au fost clivați cu restrictazele *SpeI* și *SalI* și introduși în pGREG595 (între situsurile *SpeI* și *SalI*, concomitent cu eliminarea fragmentului myGFP din vector (Figura 5). Prin acest procedeu se înlocuiește fragmentul myrGFP cu myrGFP-MeBSeq, rezultând pGREG596Δ-myGFP-MeBSeq. În curs de desfășurare.

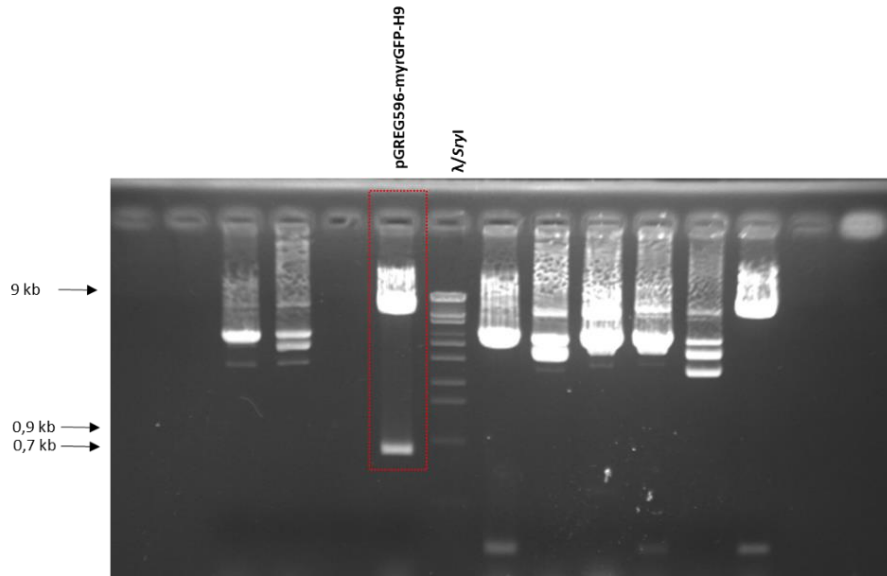


Fig. 5. Electroforegrama fragmentelor obținute la verificarea clonării corecte a ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (His rich) obținuți prin PCR în pGREG596. Ampliconii și pGREG596 au fost clivați cu *SpeI* + *SalI*, fragmentele a fost ligate cu ADN ligaza, amestecul de ligare fiind utilizat pentru transformarea celulelor competente de *Escherichia coli*. Ulterior au fos izolate plasmidele din colonii ampicilin-rezistente, iar acestea au fost verificate pentru corectitudine prin re-clivare cu *SpeI* + *SalI*. Chenarul roșu indică un rezultat pozitiv.

Au fost obținute clone pozitive pentru pGREG596Δ-myGFP-H6, pGREG596Δ-myGFP-H8, pGREG596Δ-myGFP-H9 (Figura 9) și pGREG596Δ-myGFP-H10. *În curs de desfășurare.*

T4. Transformarea drojdiei cu constructele obținute. Au fost obținuți transformanți pentru toate plasmidele pozitive. *În curs de desfășurare.*

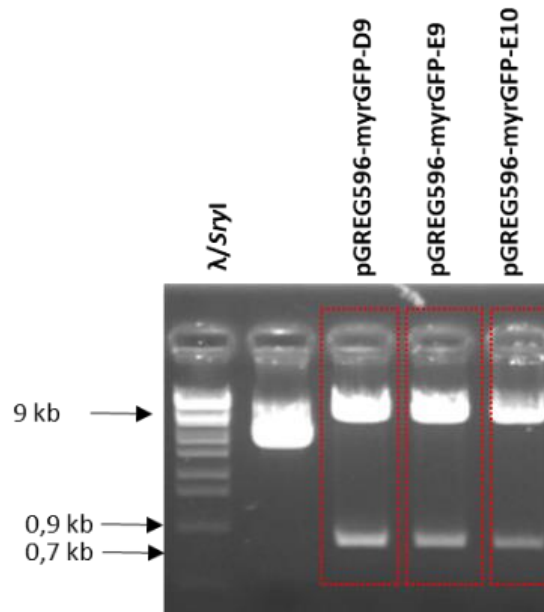


Fig. 7. Electroforegrama fragmentelor obținute la verificarea clonării corecte a ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (carboxi-rich) obținuți prin PCR în pGREG596. Ampliconii și pGREG596 au fost clivați cu *SpeI* + *SalI*, fragmentele a fost ligate cu ADN ligaza, amestecul de ligare fiind utilizat pentru transformarea celulelor competente de *Escherichia coli*. Ulterior au fos izolate plasmidele din colonii ampicilin-rezistente, iar acestea au fost verificate pentru corectitudine prin re-clivare cu *SpeI* + *SalI*. Chenarul roșu indică un rezultat pozitiv.

Au fost obținute clone pozitive pentru pGREG596Δ-myrgGFP-D6, pGREG596Δ-myrgGFP-D8, pGREG596Δ-myrgGFP-D9 (Figura 9) și pGREG596Δ-myrgGFP-E6, pGREG596Δ-myrgGFP-E8, pGREG596Δ-myrgGFP-E9 (Figura 9) și pGREG596Δ-myrgGFP-E10 și (Figura 9). *În curs de desfășurare.*

T3. Transformarea drojdiei cu constructele obținute.

Au fost obținuți transformanți pentru toate plasmidele pozitive. *În curs de desfășurare.*

T4. Verificați transformanților obținuți pentru expresia și localizarea GFP marcate prin PCR cu revers-transcripție, microscopie cu fluorescență și western blot. *În curs de desfășurare.*

A1.4: Identificarea unor condiții adecvate pentru prepararea culturilor de drojdie pentru spectroscopie EPR. (din O2)

Pentru identificarea unor condiții celulare optime pentru exprimarea myrGFP-MeBSeq au fost selectate 4 linii celulare cunoscute a avea modificări în transportul și acumularea ionilor metalici: BY4741 (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*), considerată linie parentală sau linie sălbatică (WT, wild type) și liniile null-mutante *pmr1Δ* (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; pmr1::kanMX4*), *smf1Δ* (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; smf1::kanMX4*), și *pho84Δ* (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; pho84::kanMX4*), în care genele *PMR1*, *SMF1* și respectiv *PHO84* au fost înlocuite cu gena pentru rezistență la G418. Liniile celulare au fost achiziționate de la European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF, www.euroscarf.de). Linia defectivă în gena *PMR1* (*pmr1Δ*) este o linie hiperacumulatoare de ioni metalic comparativ cu WT, pe când liniile defective în *SMF1* (*smf1Δ*) sau în *PH84* (*pho84Δ*) acumulează mai puțin decât WT.

T1. Optimizarea tamponului de suspensie celulară.

Replicarea celulelor în mediu lichid YPD: Cele 4 linii celulare, *WT*, *PMR1*, *SMF1* și *PH84*, au fost incubate în 5 ml mediu YPD într-un incubator cu shaker la 28 °C 150 de rotații pe minut timp de 24 de ore. Ulterior 1.5 ml de suspensie celulară a fost adăugată în 4.5 ml mediu de creștere YPD și au fost incubate din nou la 28 °C 150 de rotații pe minut timp de 1.5 ore, timp care reprezintă un ciclu de replicare a celulelor.

T2. Testare pentru stadiul optim de creștere.

După incubare populațiile de celule au fost analizate prin spectroscopie UV-Vis la 400 nm pentru a determina densitatea optică (DO) care indică gradul de creștere (Tabelul 1). La toate cele 4 linii celulare DO este mai mare decât 1 având valori similare DO ~ 1.3, indicând o creștere optimă a celulelor. Pentru toate liniile celulare s-au efectuat 6 măsurători diferite.

Tab. 1 Densitatea optică determinată prin spectroscopie UV-vis a celor 4 linii celulare înainte de incubare în prezența metalelor esențiale.

WT	PMR1	SMF1	PH84
1.229	1.204	1.335	1.348
1.29	1.301	1.369	1.395
1.337	1.338	1.357	1.385
1.314	1.338	1.353	1.387
1.296	1.313	1.343	1.377
1.303	1.308	1.343	1.391

T3. Testarea densității celulare optime într-o populație.

Celulele obținute mai sus au fost ulterior expuse unei concentrații de 2 mM ioni de Mn^{2+} , pentru care s-au folosit 2 mL de suspensie celulară obținută mai sus la care s-a adăugat $MnCl_2$ în concentrația dorită. Celulele au fost incubate ulterior timp de 2 ore la 28 °C, 150 de rotații pe

minut după care Do a fost din nou evaluata, rezultatele fiind expuse în Tabelul 2, și indica o creștere normală a celulelor, evidențiind caracterul non toxic a concentrației de Mn.

Tab. 2 Densitatea optica determinata prin spectroscopie UV-vis a celor 4 linii celulare dupa incubare in prezenta a 2 mM ioni de Mn^{2+} timp de 2 ore.

WT	PMR1	SMF1	PH84
1.49	1.458	1.553	1.576
1.513	1.512	1.573	1.59
1.536	1.58	1.569	1.63
1.52	1.58	1.605	1.606
1.515	1.557	1.58	1.617
1.507	1.52	1.58	1.622

T4. Testarea posibilităților de stocare a probelor.

Probele de celule obținute au fost stocate la 8 °C timp de o săptămâna, după care au fost replicate cu succes după schema descrisa mai sus, indicând o stabilitate foarte buna fără risc de contaminare cu agenți bacterieni.

A1.5: Cultura celulară a tulpinilor de drojdie care exprimă diverse GFP-MeBPep în medii sintetice care imită mediile obișnuite, care conțin concentrații scăzute, dar definite de metale esențiale. Caracterizare prin spectroscopia EPR. (din O2, partea 1) și A1.6: Cultura celulară a tulpinilor de drojdie care exprimă diverse GFP-MeBPep în medii sintetice care conțin concentrații mai mari decât cele normale, dar definite de metale esențiale. Caracterizare prin spectroscopia EPR (din O3, partea 1) În desfășurare

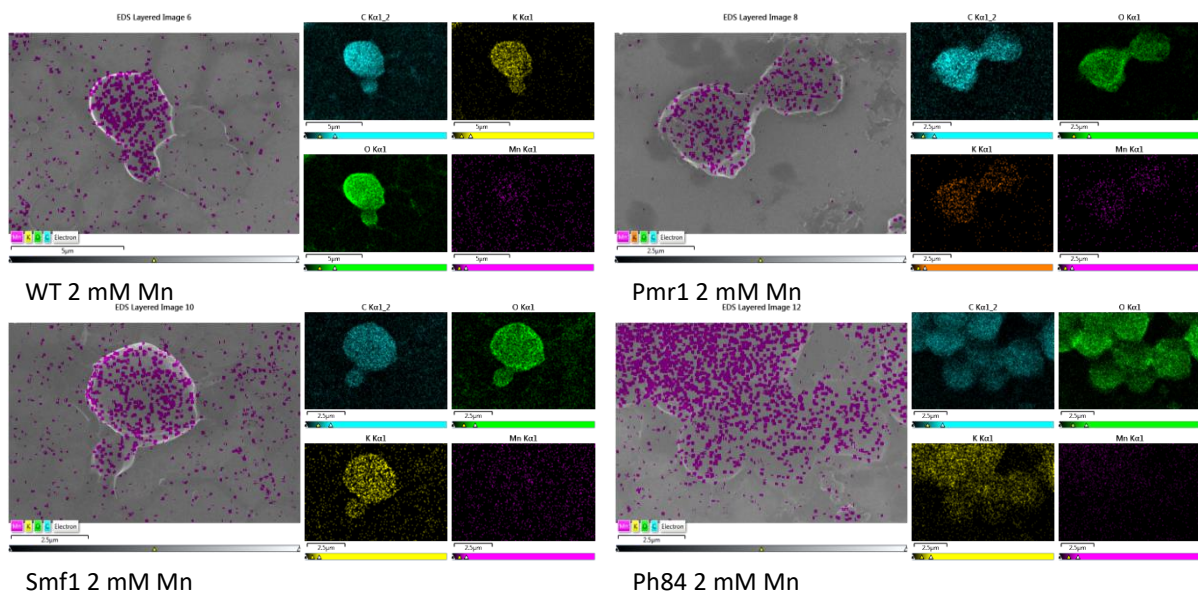


Fig.8 Imagine TEM a liniilor celulare WT, PMR1, SMF1 și PH84 împreună cu maparea elementelor principale C, K, O și Mn.

Culturile de culele *WT*, *PMR1*, *SMF1* și *PH84* au fost incubate în prezența metalelor esențiale, în acest caz ioni de Mn^{2+} , variind timpul de expunere și concentrația metalelor. După expunere culturile de celule au fost spălate de 3 ori pentru a elimina surplusul de metalele din mediu. Pentru spălare celulele au fost centrifugate timp de 3 min la 3000 rotații pe minut după care soluția reziduală a fost îndepărtată și s-a folosit un tampon Mes/Tris pentru a le spăla. Acest proces a fost repetat de 3 ori pentru a asigura îndepărtarea tuturor ionilor de Mn^{2+} din soluție.

Măsurătorile efectuate prin microscopia electronica prin transmisie (TEM) împreună cu EDS și mapping (Figura 8) arată ca ionii de Mn^{2+} ramași sunt legați / acumulați în celule, fiind eliminați cei nelegați ramași în suspensie.

T1. Profilarea EPR a celulelor crescute în medii care imită condițiile standard în ceea ce privește concentrațiile de urme de metal.

Pentru a determina condițiile optime de creștere a liniilor celulare *WT*, *PMR1*, *SMF1* și *PH84* în prezența ionilor de Mn^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopica EPR concentrația de Mn și timpii de incubare au fost variați. Au fost analizate două concentrații de Mn 0.25 și 0.5 mM cu timpi de incubare de 60 min, 4 ore și 24 ore respectiv 20, 40, 60 și 90 minute. După incubare toate probele au fost spălate cu procedura descrisă mai sus, iar pentru măsurători s-au folosit 30 μ L de celule. Aceste prime rezultate sunt prezentate în Figura 9.

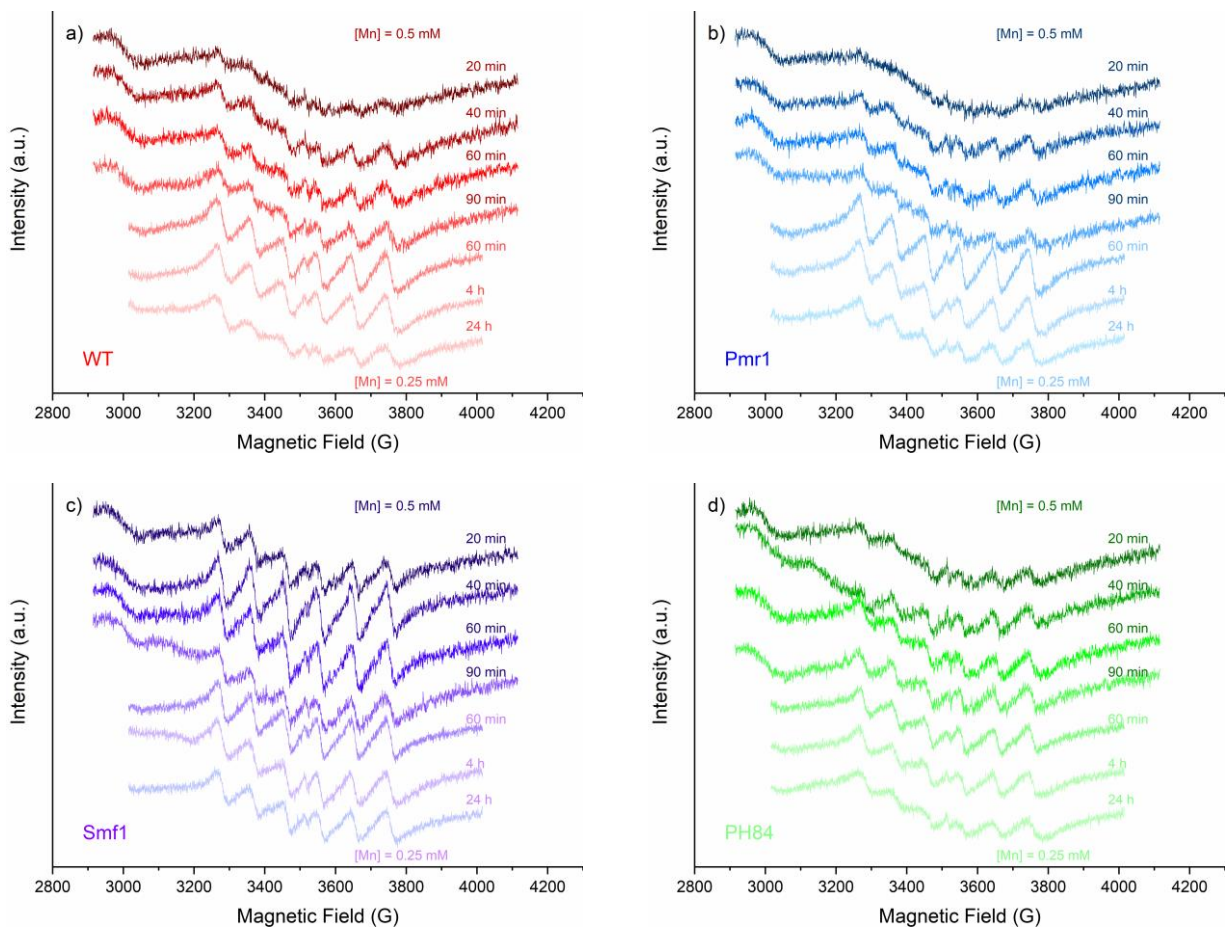


Fig. 9 Spectre EPR a liniilor celulare *WT* (a), *PMR1* (b), *SMF1* (c) și *PH84* (d) în prezența a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații de 0.25 și 0.5 mM după diferiți timpi de incubare.

Spectrele EPR din Figura 9 indică o mai bună asimilare a ionilor de Mn^{2+} cu o concentrație de 0.25 mM după timpi de incubare lungi de aproximativ 4 ore. La concentrația de 0.5 mM chiar

si după 90 minute de incubare semnalul EPR măsurat este mai slab, indicând o mai slaba incorporare a ionilor in celule probabil datorat timpilor foarte scurți de incubare si a concentrației mai ridicate de ioni de Mn care poate inhiba creșterea celulara.

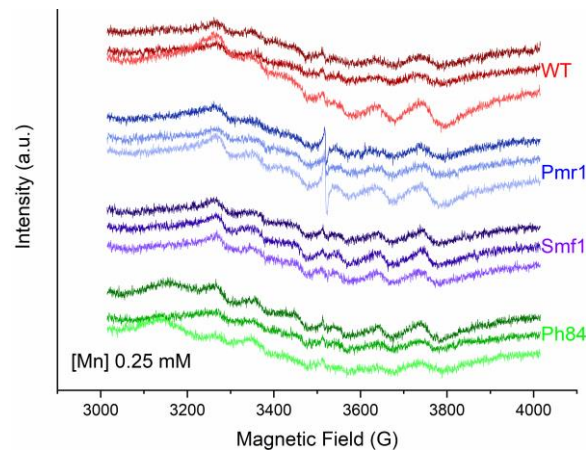


Fig. 10 Spectre EPR a liniilor celulare *WT*, *PMR1*, *SMF1* si *PH84* in prezenta ionilor de Mn^{2+} cu o concentrație de 0.25 mM după ora de incubare.

Pentru a determina replicabilitatea experimentelor fiecare linie celulara a fost crescuta in condiții similare, fiecare experiment fiind repetat de 3 ori. Pentru aceste teste s-a folosit o concentrație de 0.25 mM Mn si un timp de incubare de o ora. Spectrele EPR prezentate in Figura 10 arata o foarte buna stabilitate a metodelor folosite pentru creșterea si incubarea celulelor in prezenta ionilor de Mn^{2+} , spectrele EPR a fiecărei linii celulare fiind foarte similare, ceea ce indica o variație foarte mica a concentrației de Mn asimilata / legata de cele 4 linii celulare folosite WT, PMR1, SMF1 si PH84.

T2. Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale si **T2.** Profilul EPR a celulelor crescute în medii care conțin condiții standard în ceea ce privește concentrațiile de urme de metal + un ion paramagnetic în concentrație mare, dar netoxică.

Pentru a testa capacitatea liniilor celulare folosite WT, PMR1, SMF1 si PH84, concentrația de ioni de Mn^{2+} a fost variata de la 0 la 2 mM la un timp de incubare de 30 de minute. Spectrele EPR sunt prezentate in Figura 11. Semnalul EPR a celor 4 linii celulare in prezenta ionilor de Mn cu o concentrație mai mica sau egala cu 1 mM are o intensitate similara. Intensitatea semnalului EPR pentru concentrații de Mn de 0.5, 0.75 si 1 mM are aceiași intensitate, contrar așteptărilor unde semnalul ar trebui sa crească linear cu concentrația de Mn, indicând un mecanism al celulelor de blocare a metalelor. La concentrația de 2 mM Mn semnalul EPR creste puternic in cazul tuturor liniilor celulare, indicând o hiperacumulare a ionilor de Mn la nivelul celulelor.

In Figura 12 sunt prezentate spectrele EPR a liniilor celulare WT, PMR1, SMF1 si PH84 in prezenta ionilor de Mn^{2+} cu concentrații între 0 si 2 mM. Timpul de incubare in acest caz a fost de 1 ora. Se observa o creștere semnificativa a semnalelor EPR a ionilor de Mn^{2+} chiar si la concentrații mici de 0.5 mM in comparative cu semnalele observate in Figura 11, unde la aceste concentrații semnalul EPR era mult mai mic, indicand o acumulare in timp la nivel celular a ionilor de metal.

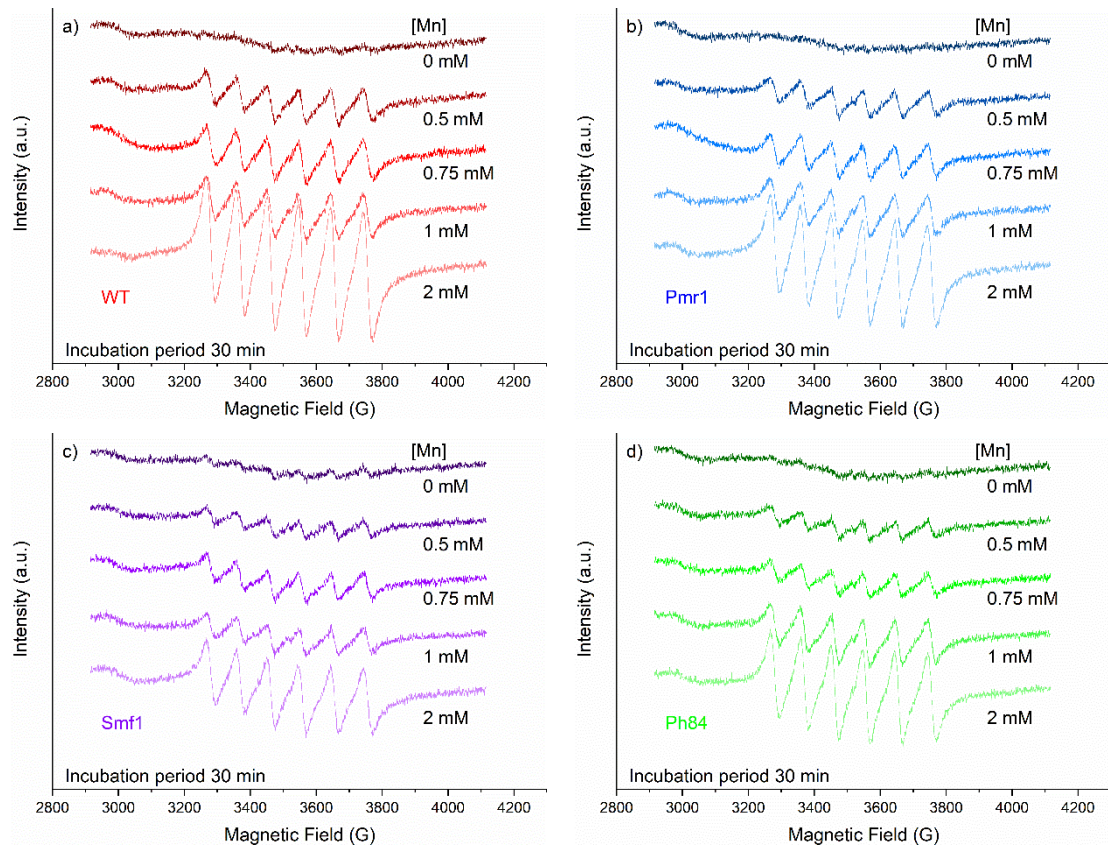


Fig. 11 Spectre EPR a liniilor celulare *WT* (a), *PMR1* (b), *SMF1* (c) si *PH84* (d) in prezenta a ionilor de Mn²⁺ cu concentrații variind de la 0 la 2 mM după 30 de minute de incubare.

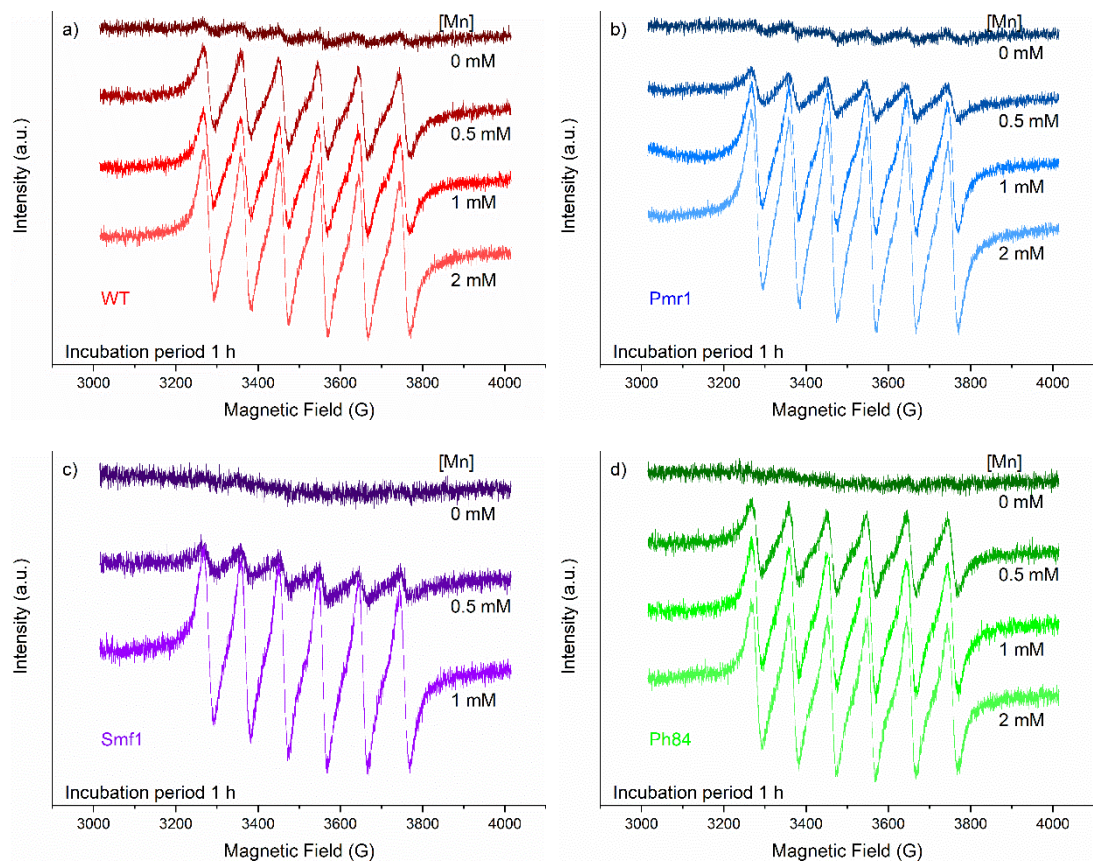


Fig. 12 Spectre EPR a liniilor celulare *WT* (a), *PMR1* (b), *SMF1* (c) si *PH84* (d) in prezenta a ionilor de Mn²⁺ cu concentrații variind de la 0 la 2 mM după 1 ora de incubare.

T1. Test de toxicitate. Stabilirea celei mai mari concentrații de metal netoxic pentru fiecare tulpină.

Concentrațiile de ioni de Mn^{2+} (≤ 2 mM) folosite în tratamentul liniilor celulare WT, PMR1, SMF1 și PH84 s-au dovedit a fi netoxice, obținându-se colonii de celule viabile chiar și după incubări de 24 de ore în prezența ionilor metalici. În măsurătorile planificate în etapa următoare a proiectului v-or fi folosite și concentrații mai mari pentru stabilirea celei mai mari concentrații netoxice pentru fiecare tulpină.

Website

Website-ul proiectului a fost încărcat și actualizat în platforma.

Referințe:

[1] Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y. and Whiteway, M., 2005. Drag&Drop cloning in yeast. *Gene*, 344, pp.43-51.

Sumar al progresului (livrabile realizate, indicatori de rezultat, diseminarea rezultatelor, justificare diferențe, dacă e cazul)

A1.1: Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys (din O1, partea 1)

A1.2: Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His (din O1, partea 1)

A1.3: Generarea de structuri bogate în aminoacizi carboxilați (din O1)

A1.4: Identificarea unor condiții adecvate pentru prepararea culturilor de drojdie pentru spectroscopie EPR. (din O2)

A1.5: Cultura celulară a tulpinilor de drojdie care exprimă diverse GFP-MeBPep în medii sintetice care imită mediile obișnuite, care conțin concentrații scăzute, dar definite de metale esențiale. Caracterizare prin spectroscopia EPR. (din O2, partea 1)

A1.6: Cultura celulară a tulpinilor de drojdie care exprimă diverse GFP-MeBPep în medii sintetice care conțin concentrații mai mari decât cele normale, dar definite de metale esențiale. Caracterizare prin spectroscopia EPR (din O3, partea 1)

Toate obiectivele propuse au fost realizate

Website

Website-ul proiectului a fost încărcat și actualizat în platforma.

Manuscript

Un manuscris este în lucru și va fi trimis spre publicare după ce se vor efectua și măsurători EPR pe cele 4 linii celulare în prezența ionilor de Mn^{2+} la temperaturi joase (150 K), pentru a evidenția mai bine diferențele în capacitatea celor 4 tipuri de celule în a acumula metale.

Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare

A1.1: Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys, A1.2: Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His, A1.3: Generarea de structuri bogate în aminoacizi carboxilați

Au fost proiectați primeri pentru introducerea MeBPep bogată în Cys, His și aminoacizi carboxilați în celule. Ulterior myrGFP-MeBPep-(Cys/His/aminoacizi carboxilați - rich) a fost amplificat prin PCR. Ampliconilor obținuți în vectorul pGREG596, care datorită secvenței de miristoilare la capătul N-terminal al ADN-ului pentru GFP permite exprimarea pe fața interioară a membranei plasmatică, au fost clonați. Ampliconii purificați au fost incluși în vectorul pCR11 prin procedeul TA cloning pentru subclonări ulterioare în vectori de interes. În paralel, ampliconii purificați au fost clivați cu restricțazele *SpeI* și *SalI* și introduși în pGREG595 (într-un situsurile *SpeI* și *SalI*, concomitent cu eliminarea fragmentului myGFP din vector. Prin acest procedeu se înlocuiește fragmentul myrGFP cu myrGFP-MeBSeq. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 a fost transformat cu structurile obținute, obținându-se transformanți pentru toate plasmidele pozitive.

A1.4: Identificarea unor condiții adecvate pentru prepararea culturilor de drojdie pentru spectroscopie EPR.

Tamponului de suspensie celulară a fost optimizat pentru cele 4 linii celulare, *WT*, *PMR1*, *SMF1* și *PH84* și teste pentru stadiul optim de creștere au fost efectuate prin analizarea populațiilor de celule prin spectroscopia UV-Vis la 400 nm pentru a determina densitatea optică (DO) care indică gradul de creștere. Prin aceeași metodă densitățile celulare optime într-o populație a fost determinată.

A1.5: Cultura celulară a tulpinilor de drojdie care exprimă diverse GFP-MeBPep în medii sintetice care imită mediile obișnuite, care conțin concentrații scăzute, dar definite de metale esențiale. Caracterizare prin spectroscopia EPR.

Culturile de celule *WT*, *PMR1*, *SMF1* și *PH84* au fost incubate în prezența metalelor esențiale, în acest caz ioni de Mn^{2+} , variind timpul de expunere și concentrația metalelor. Măsurătorile efectuate prin microscopia electronică prin transmisie (TEM) împreună cu EDS și mapping arată că ionii de Mn^{2+} ramași sunt legați / acumulați în celule, fiind eliminați cei nelegați ramași în suspensie.

Pentru a determina condițiile optime de creștere a liniilor celulare folosite în prezența ionilor de Mn^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopică EPR concentrația de Mn și timpii de incubare au fost variați. Au fost analizate diferite concentrații de Mn la diferiți timpi de incubare. Timpii de incubare de 30 și 60 de minute și concentrații de Mn sub 1 mM s-au dovedit a cele mai favorabile pt spectroscopia EPR.

A1.6: Cultura celulară a tulpinilor de drojdie care exprimă diverse GFP-MeBPep în medii sintetice care conțin concentrații mai mari decât cele normale, dar definite de metale esențiale. Caracterizare prin spectroscopia EPR

Pentru a testa capacitatea liniilor celulare folosite *WT*, *PMR1*, *SMF1* și *PH84*, concentrația de ioni de Mn^{2+} a fost variată de la 0 la 2 mM la un timp de incubare de 30 și 60 de minute. Semnalul EPR a celor 4 linii celulare în prezența ionilor de Mn cu o concentrație mai mică sau egală cu 1 mM prezintă intensități similare, indicând un mecanism al celulelor de blocare a metalelor. La concentrația de 2 mM Mn semnalul EPR crește puternic în cazul tuturor liniilor celulare, indicând o hiperacumulare a ionilor de Mn la nivelul celulelor.