

Raport Științific:

Titlu proiect:

CARACTERIZAREA CELULELOR CARE SUPRAEXPRIMĂ PEPTIDE CU AFINITATE PENTRU METALE GRELE PRIN TEHNICI DE REZONANȚĂ ELECTRONICĂ PARAMAGNETICĂ (EPR)

Cod depunere: **PN-III-P1-1.1-PD-2021-0024**

CONTRACTUL DE FINANȚARE NR.: **PD 107 din 29/04/2022**

Etapă 2 –

Diversificarea colecției de tulpini de drojdie care exprimă peptide de legare a metalelor (MeBPep) cu localizare celulară diferită (O1, partea 2).

Amprentarea EPR a celulelor de drojdie obținute în O1, în condiții normale, cu concentrație scăzută de metale (O2, partea 2) și cu concentrație ridicată de metale (O3, partea 2).

Dezvoltarea unui software conceput pentru a discrimina profilurile EPR ale tulpinilor de drojdie care exprimă diferite MeBPep (O4, partea 1).

- raport de cercetare privind obținerea de MeBP bogat în Cys și His (Obiectivul 1) proiectate și clonate
- raport științific privind caracterizarea prin spectroscopia EPR a proteinelor menționate anterior în prezența metalelor esențiale (Obiectivele 2 și 3)
- un script MATLAB care folosește rutina EasySpin pentru a simula spectrele EPR obținute
- al doilea manuscriptului finalizat trimis spre publicare
- două comunicări la conferințe internaționale

Act 2.1 - Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys ((din O1, partea 2)

T1. Verificarea transformanților pentru expresia și localizarea GFP marcate prin PCR cu transcripție inversă, microscopie cu fluorescență și western blot.

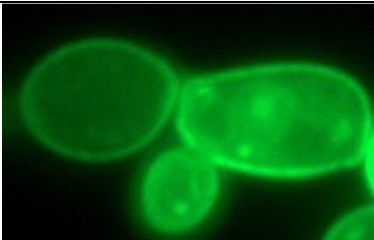
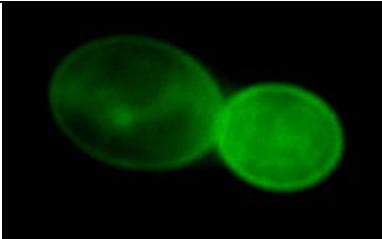
În etapa anterioară s-au obținut plasmide ADN care conțin caseta myrGFP marcată la capătul C-terminal cu secvențe de aminoacizi cu conținut mare de cisteină (Cys/C). Celulele de *Saccharomyces cerevisiae* transformate cu plasmidele respective ar trebui să exprime variante de GFP ancorate de fața internă a membranei plasmatică marcate cu diferite peptide bogate în cisteină. Structura generală a unei astfel de variante GFP este

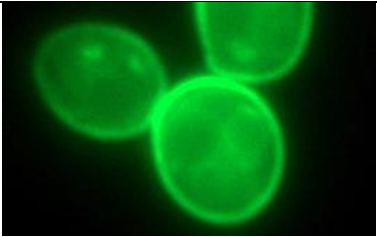
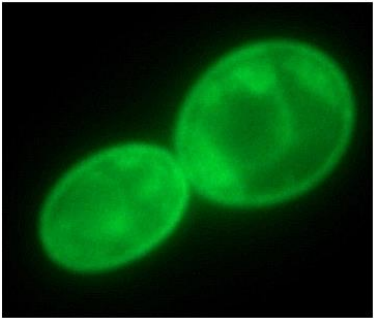
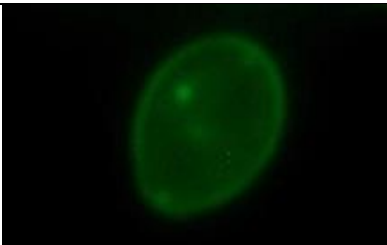
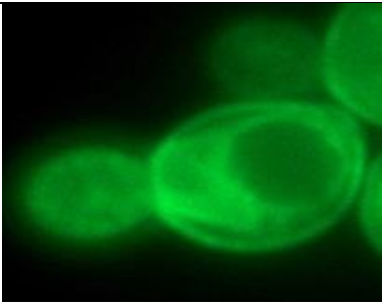
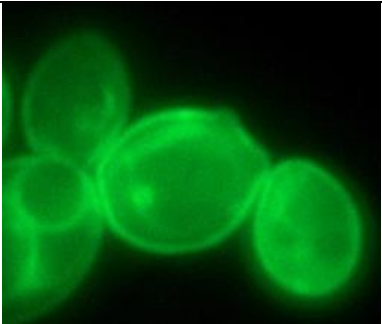
MGCTVSTQTISKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKL
PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHTGMDEL-
CysRichSeq*,

unde secvența evidențiată în galben este secvența semnal pentru miristoilare (care permite ancorarea de fața interă a membranei plasmatică), cu verde este secvența în aminoacizi a proteinei verzi fluorescente (GFP) și cu cian secvența CysRichSeq, care reprezintă tag-ul peptidic bogat în resturi cisteinil. Asteriscul este corespunde codonului STOP.

În etapa anterioară au fost obținute plasmidele pIF-myrGFP-CysRichSeq, conform tabelului de mai jos. Introducerea corectă a secvențelor a fost făcută inițial prin secvențiere ADN. Plasmidele au fost introduse în celulele de *Saccharomyces cerevisiae* prin procesul de transformare (metoda cu acetat de litiu). Eficiența transformării a fost verificată prin microscopie de fluorescență (Tabel 1)

Tabel 1. Verificarea exprimării myrGFP-HisRichSeq prin microscopie de fluorescență.

Plasmid	Secvență aminoacizi introdusă (CysRichSeq)	Imagini microscopice ale celulelor care exprimă myrGFP-CysRichSeq
pIF-myrGFP-C6	Cys6	
pIF-myrGFP-C8	Cys8	

pIF-myrGFP-C9	Cys9	
pIF-myrGFP-C10	Cys10	
pIF-myrGFP-CD3	(CysAsp)3	
pIF-myrGFP-CD5	(CysAsp)5	
pIF-myrGFP-CE3	(CysGlu)5	

Exprimarea corectă a fost verificată și prin RT-PCR și western-blotting (Figura 1)

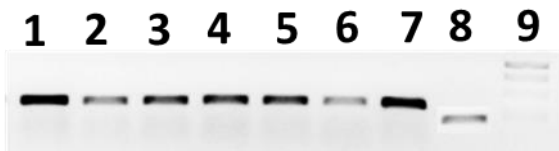


Fig. 1. Analiza prin *western blot* a exprimării myr-GFP-CysRichSeq. 1: Cys6; 2: Cys8; 3: Cys9; 4: Cys10; 5: (CysAsp)3; 6: (CysAsp)5; 7: (CysGlu)5; 8: non-tagged GFP; 9: marker. Celulele de *S. cerevisiae* transformate cu plasmidele corespunzătoare au fost crescute pe mediu selectiv (SD-Ura) înainte de a fi recoltate pentru obținerea proteinelor totale. Proteinele totale din fiecare linie celulară au fost separate prin SDS-PAGE apoi amprentate pe o membrană PVDF. Anticorp primar: anticorp anti-GFP (iepure). Anticorp secundar: anticorp anti IgG iepure marcat ECL.

Act 2.2 - Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His (din O1, partea 2)

T2. Verificarea transformanților pentru expresia și localizarea GFP marcate prin PCR cu transcripție inversă, microscopie cu fluorescență și western blot.

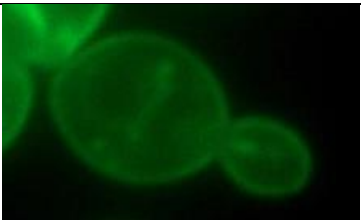
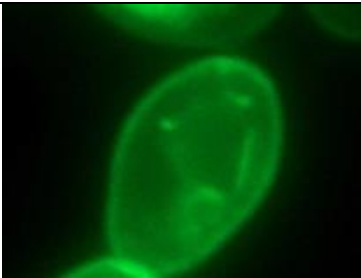
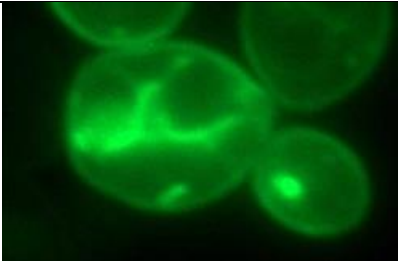
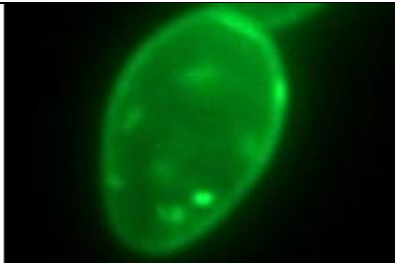
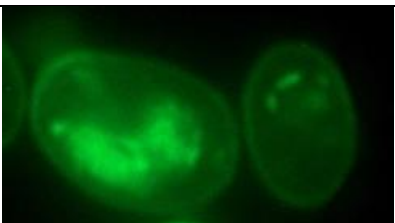
În etapa anterioară s-au obținut plasmide ADN care conțin caseta myrGFP marcată la capătul C-terminal cu secvențe de aminoacizi cu conținut mare de histidină (His/H). Celulele de *Saccharomyces cerevisiae* transformate cu plasmidele respective are trebui să exprime variante de GFP ancorate de fața internă a membranei plasmatică marcate cu diferite peptide bogate în cisteină. Structura generală a unei astfel de variante GFP este

MGCTVSTQTISKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKICTTGKL
PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYSTQSAISKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDEL-
HisRichSeq*,

unde secvența evidențiată în galben este secvența semnal pentru miristoilare (care permite ancorarea de fața interă a membranei plasmatică), cu verde este secvența în aminoacizi a proteinei verzi fluorescente (GFP) și cu cian HisRichSeq este tag-ul peptidic bogat în resturi histidil. Asteriscul este corespunde codonului STOP.

În etapa anterioară au fost obținute plasmidele pIF-myrGFP-HisRichSeq, conform tabelului de mai jos. Introducerea corectă a secvențelor a fost făcută inițial prin secvențiere ADN. Plasmidele au fost introduse în celulele de *Saccharomyces cerevisiae* prin procesul de transformare (metoda cu acetat de litiu). Eficiența transformării a fost verificată prin microscopie de fluorescență (Tabel 2)

Tabel 2. Verificarea exprimării myrGFP-HisRichSeq prin microscopie de fluorescență.

Plasmid	Secvență aminoacizi introdusă (CysRichSeq)	Imagini microscopice ale celulelor care exprimă myrGFP-CysRichSeq
pIF-myrGFP-H6	His6	
pIF-myrGFP-H8	His8	
pIF-myrGFP-H9	His9	
pIF-myrGFP-H10	His10	
pIF-myrGFP-HD5	(HisAsp)5	
pIF-myrGFP-HE3	(HisGlu)5	

Exprimarea corectă a fost verificată și prin RT-PCR și western-blotting (Figura 2).

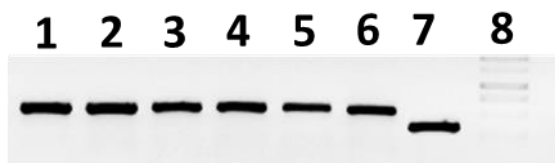


Fig. 2. Analiza prin *western blot* a exprimării myr-GFP-HisRichSeq. 1: His6; 2: His8; 3: His9; 4: His10; 5: (HisAsp)5; 6: (HisGlu)5; 7: non-tagged GFP; 8: marker. Celulele de *S. cerevisiae* transformate cu plasmidele corespunzătoare au fost crescute pe mediu selectiv (SD-Ura) înainte de a fi recoltate pentru obținerea proteinelor totale. Proteinele totale din fiecare linie celulară au fost separate prin SDS-PAGE apoi amprentate pe o membrană PVDF. Anticorp primar: anticorp anti-GFP (iepure). Anticorp secundar: anticorp-anti IgG iepure marcat ECL.

Pentru experimentele EPR au fost alese liniile care au prezentat o intensitate mai mare a expresiei GFP-urilor recombinante, și anume:

- Linia BY4747-myrGFP (control), transformată cu care exprimă non-tagged myrGFP
- Linia 4: linia care exprimă pIF-myrGFP-CE5: myrGFP marcat cu decapeptidul (CysGlu)5
- Linia 5: linia care exprimă pIF-myrGFP-HD5: myrGFP marcat cu decapeptidul (HisAsp)5
- Linia 22: linia care exprimă pIF-myrGFP-HE5: myrGFP marcat cu decapeptidul (HisGlu)5
- Pe lângă aceste linii, au fost folosite și liniile E10: myrGFP marcat cu decapeptidul Glu10.

Aceste linii au fost alese pentru potențialul secvențelor tag de a lega ionii de Mn(II) și Cu(II).

Act 2.3 - 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 2)

- Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu concentrații cunoscute de Cu(II).

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 au fost incubate în prezenta metalelor esențiale, în acest caz ioni de Cu^{2+} , variind timpul de expunere și concentrația. 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 Cu^{2+} din soluție.

Pentru a determina condițiile optime de creștere a liniilor By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 în prezența ionilor de Cu^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopică EPR concentrația de Cu și timpii de incubare au fost variați. Au fost analizate două concentrații de Cu 0.5 și 2 mM cu timpii de incubare de 30 min și 1 ora. După incubare toate probele au fost spălate cu procedura descrisă mai sus, iar pentru măsurători s-au folosit 30 μL de celule. Aceste prime rezultate sunt prezentate în Figura 3 unde sunt arătate spectrele liniilor celulare menționate mai sus în prezența unei concentrații de Cu de 0.5 mM și timp de incubare de 30 min. La timpii de incubare și concentrații mai ridicate, liniile celulare s-au dovedit a fi foarte sensibile, ele nerezistând expunerii la ionii de Cu^{2+} .

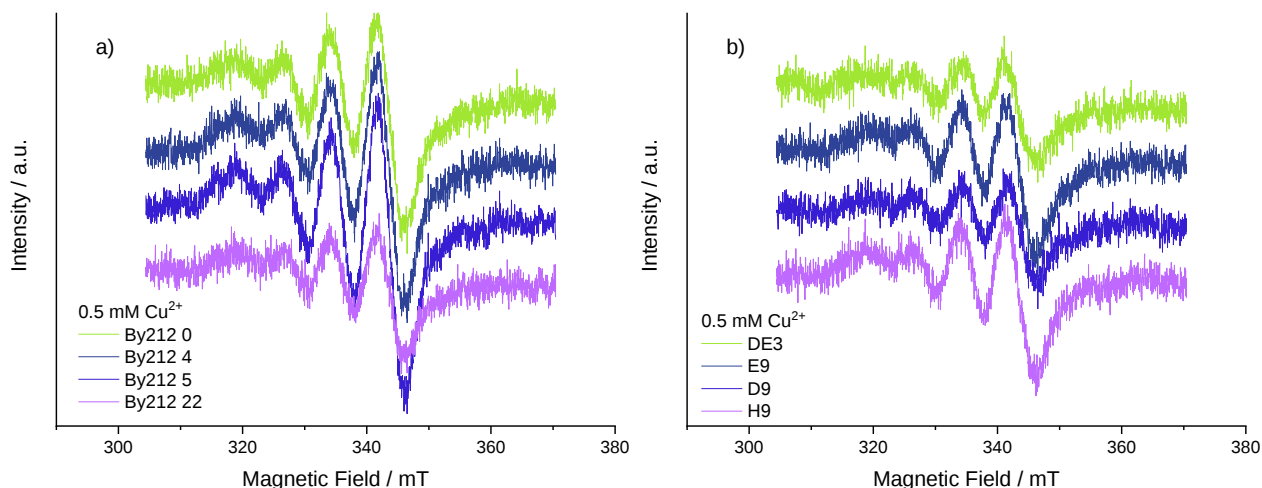


Fig. 3: Spectre EPR a liniilor celulare By212 0, 4, 5 și 22 (a) și DE3, E9, D9 și H9 (b) în prezența a ionilor de Cu^{2+} cu concentrații de 0.5 mM după 30 min de incubare.

Spectrele EPR din Figura 3 indică o mai bună asimilare a ionilor de Cu^{2+} cu o concentrație de 0.5 mM după timpii de incubare scurți de aproximativ 30 min. La concentrații și timpii de incubare mai mari semnalul EPR nu a putut fi detectat, indicând că ionii de Cu^{2+} au inhibat creșterea celulară.

- Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu concentrații cunoscute de Mn(II) .

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 au fost incubate în prezența metalelor esențiale, în acest caz ioni de Mn^{2+} , variind concentrația. 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.

Pentru a determina condițiile optime de creștere a liniilor By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 în prezența ionilor de Mn^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopică EPR concentrația de Mn a fost variată. Au fost analizate două concentrații de Mn 1 și 3 mM cu timpii de incubare de 30 min. După incubare toate probele au fost spălate cu procedura descrisă mai sus, iar pentru măsurători s-au folosit 30 μL de celule. Aceste prime rezultate sunt prezentate în Figura 4 unde sunt arătate spectrele liniilor celulare menționate mai sus în prezența unei concentrații de Mn de 1 și 3 mM și timp de incubare de 30 min. Semnalul

specific ionilor de Mn^{2+} este vizibil la ambele concentrații în cazul tuturor liniilor celulare. La o concentrație de 1 mM Mn nu sunt evidente schimbări în semnalul EPR indicând că toate liniile asimilează ioni de Mn^{2+} în aceeași proporție. La creșterea concentrației de Mn la 3 mM, sunt observabile diferențe în intensitatea semnalului EPR, indicând că linia By212 5 asimilează cea mai ridicată concentrație de Mn^{2+} .

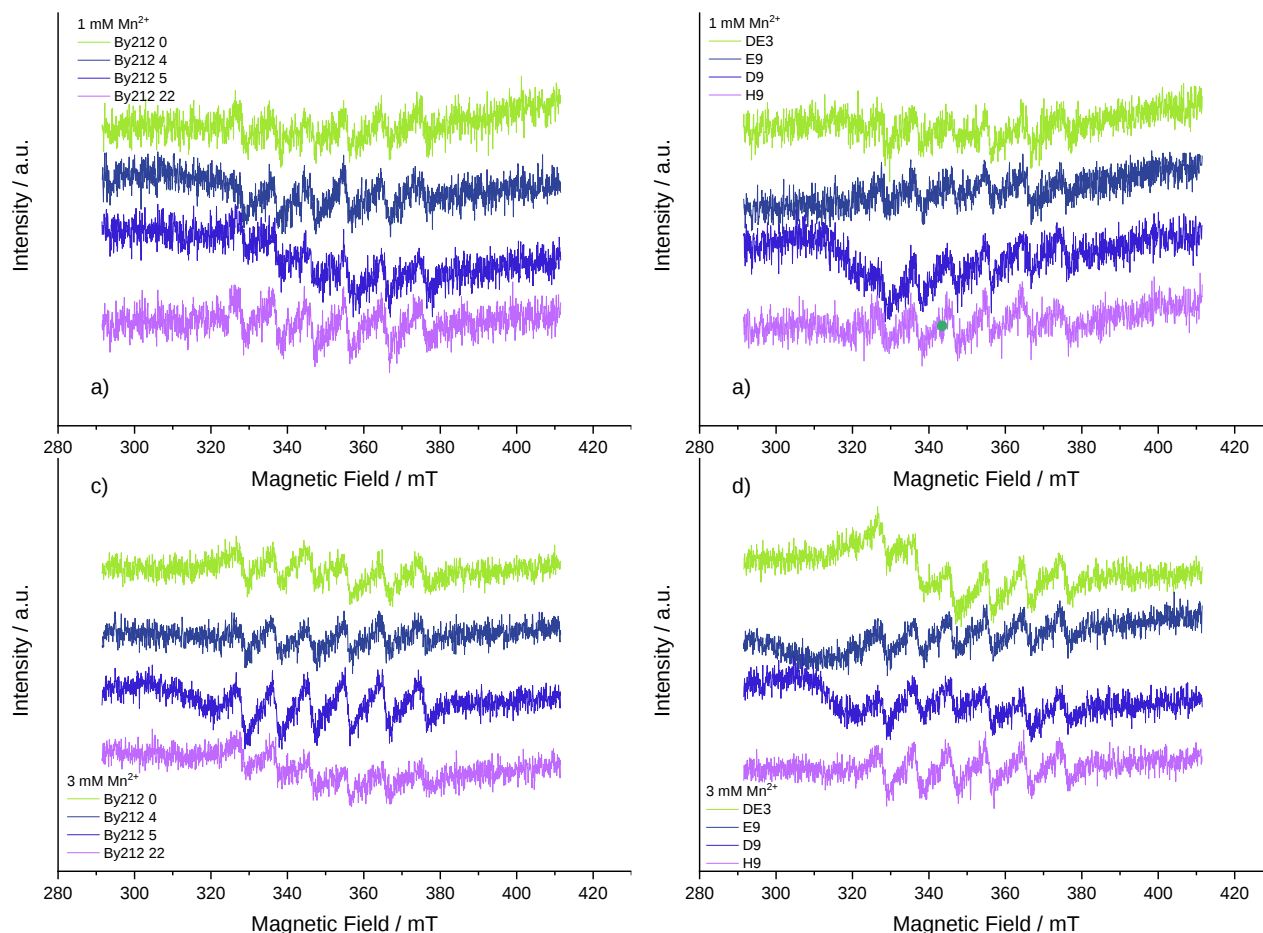


Fig. 4: Spectre EPR a liniilor celulare By212 0, 4, 5, 22 (a, c) și DE3, E9, D9 și H9 (b, d) în prezența a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații de 1 mM respectiv 3 mM după 30 min de incubare.

- Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu concentrații cunoscute de alți ioni paramagnetici.

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 au fost incubate în prezența metalelor esențiale, în acest caz ioni de Mn^{2+} și Cu^{2+} în 3 serii diferite. 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 Cu^{2+} din soluție. După spălare celule obținute în cele 3 serii diferite au fost combinate, astfel concentrația de celule expuse la metale a fost îmbunătățită.

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 si DE3, E9, D9, H9 au fost incubate in prezenta metalelor esențiale, in acest caz ioni de Mn^{2+} cu o concentrație determinată anterior de 3 mM si Cu^{2+} cu o concentrație de 0.5 mM. Rezultatele masuratorilor EPR sunt prezentate in Figurile 5a si 5b evidențiind prezenta ionilor de Mn^{2+} . In acelasi timp semnalul EPR a ionilor de Cu^{2+} nu este observabil, el fiind probabil suprimat de semnalul mult mai intens a ionilor de Mn^{2+} , care probabil au o mobilitate mult mai mare.

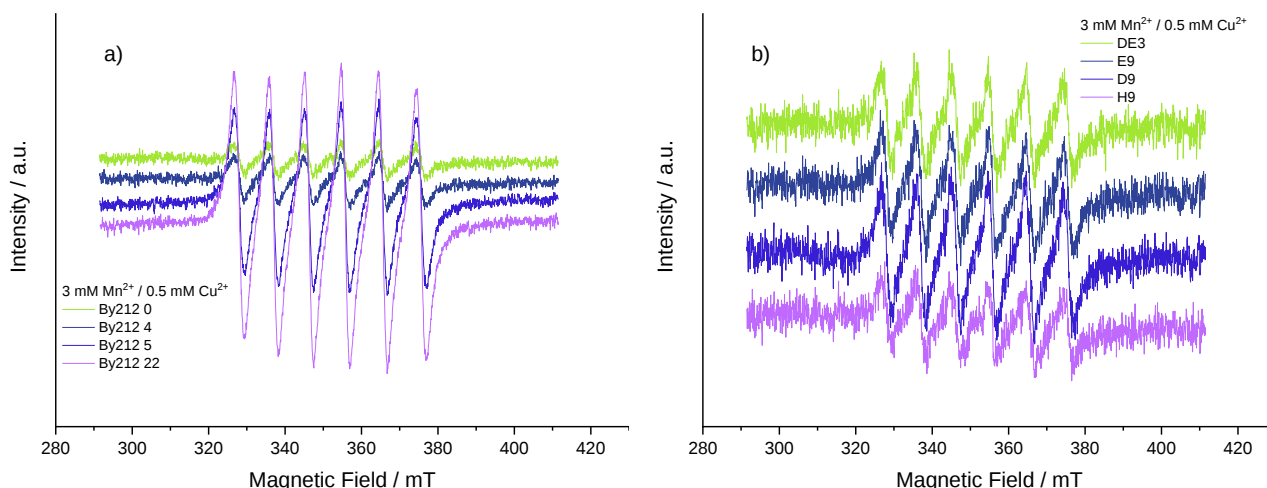


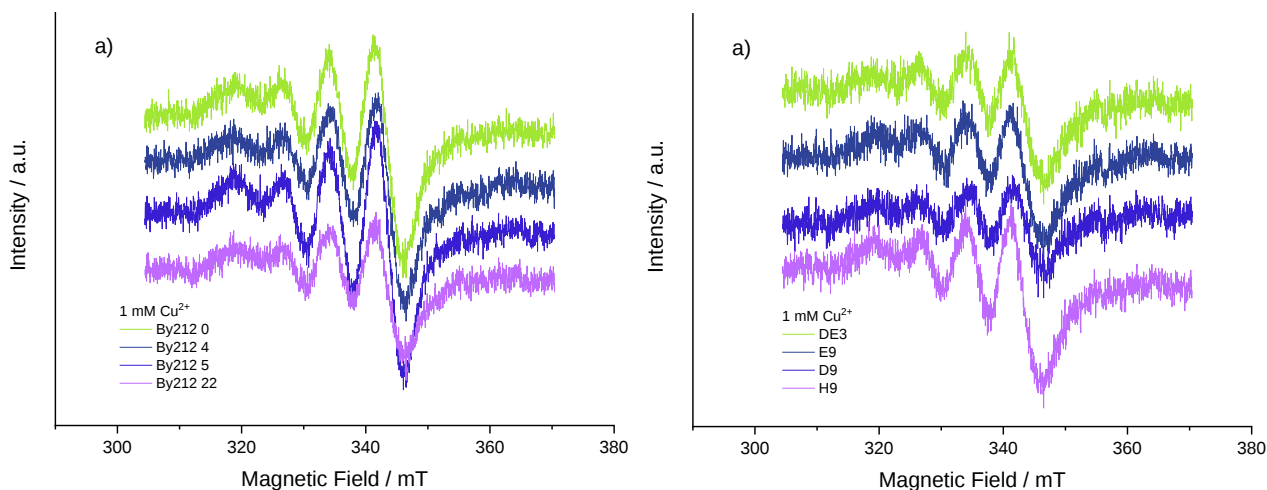
Fig. 5: Spectre EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 (a) si DE3, E9, D9 si H9 (b) in prezenta a ionilor de Mn^{2+} cu o concentrație de 3 mM si a ionilor de Cu^{2+} o concentrație de 0.5 mM după 30 min de incubare.

- Integrarea datelor. Corelația cu datele de acumulare a metalelor. Corelația cu localizarea celulară a GFP-MeBP.

Vezi Activitatea 2.5.

Act 2.4 - 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 2)

- Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate



cu Cu(II) în concentrație mare, dar netoxică.

Fig. 6: Spectre EPR a liniilor celulare By212 0, 4, 5 si 22 (a) si DE3, E9, D9 si H9 (b) în prezența ionilor de Cu²⁺ cu concentrații de 1 mM după 30 min de incubare.

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 si DE3, E9, D9, H9 au fost incubate în prezența metalelor esențiale, în acest caz ioni de Cu²⁺, 1 mM. 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 spală. Acest proces a fost repetat de 3 ori pentru a asigura îndepărtarea tuturor ionilor de Cu²⁺ din soluție.

Având în vedere sensibilitatea liniilor celulare By212 0, 4, 5, 22 si DE3, E9, D9, H9 în prezența ionilor de Cu²⁺ pentru a putea fi analizate prin metoda spectroscopică EPR o singură concentrație de 1 mM de Cu a fost utilizată cu timpi scurt de incubare de 30 min. 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 6 unde sunt arătate spectrele liniilor celulare menționate mai sus în prezența unei concentrații de Cu de 1 mM și timp de incubare de 30 min. La timpi de incubare și concentrații mai ridicate, liniile celulare s-au dovedit a fi foarte sensibile, ele nerezistând expunerii la ionii de Cu²⁺.

Spectrele EPR din Figura 6 indică o bună asimilare a ionilor de Cu²⁺ cu o concentrație de 1 mM după timpi de incubare scurți de aproximativ 30 min. La concentrații și timpi de incubare mai mari semnalul EPR nu a putut fi detectat, indicând că ionii de Cu²⁺ au inhibat creșterea celulară. Toate spectrele prezintă un semnal EPR specific Cu²⁺ în soluție, neputând fi identificate diferențe între cele 8 linii celulare, Cu²⁺ fiind asimilat și complexat în aceeași măsură.

- Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu Mn(II) în concentrație mare, dar netoxică.

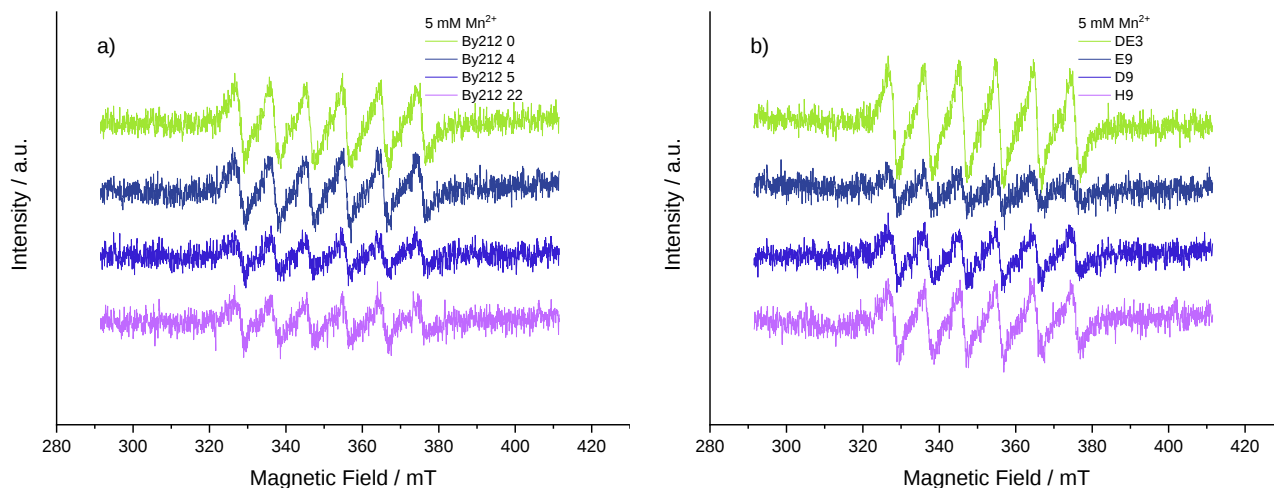


Fig. 7 Spectre EPR a liniilor celulare By212 0, 4, 5 si 22 (a) si DE3, E9, D9 si H9 (b) in prezenta a ionilor de Mn²⁺ cu concentrații de 5 mM după 30 min de incubare.

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 si DE3, E9, D9, H9 au fost incubate in prezenta metalelor esențiale, in acest caz ioni de Mn²⁺, cu o concentratie ridicata de 5 mM. 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 reziduala a fost îndepărtata si 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 Mn²⁺ din soluție.

Pentru a determina condițiile optime de creștere a liniilor By212 0, 4, 5, 22 si DE3, E9, D9, H9 in prezenta ionilor de Mn²⁺ pentru a fi analizate prin metoda spectroscopica EPR o singura concentratie de Mn de 5 mM a fost utilizata cu timpi de incubare scurți de 30 min. După incubare toate probele au fost spălate cu procedura descrisa mai sus, iar pentru măsurători s-au folosit 30 μ L de celule. Aceste prime rezultate sunt prezentate in Figura 7 unde sunt arătate spectrele liniilor celulare menționate mai sus in prezenta unei concentrații de Mn de 5 mM si timp de incubare de 30 min. Semnalul specific ionilor de Mn²⁺ este vizibil in cazul tuturor liniilor celulare. La o concentratie de 5 mM Mn in cazul liniei By212 (Figura 7a) nu sunt evidente schimbari in semnalul EPR indicand ca toate liniile asimileaza ionii de Mn²⁺ in aceeasi proportie. In Figura 7b sunt observabile diferente in intensitatea semnalului EPR, indicand ca linia DE3 asimileaza cea mai ridicata concentratie de Mn²⁺ urmata de H9.

- Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu alți ioni paramagnetici în concentrații mari, dar netoxice.

In acest caz s-a incercat utilizarea a 5mM Mn²⁺ in combinatie cu 1 mM Cu²⁺. In urma masuratorilor EPR nu a putut fi detectat nici un semnal, indicand ca liniile celulare nu au rezista acestor concentratii de ioni de metale, toxicitatea lor fiind prea mare.

- Integrarea datelor. Corelația cu datele de acumulare a metalelor. Corelația cu localizarea celulară a GFP-MeBP.

Vezi Activitatea 2.5.

Act 2.5 - Dezvoltarea unui script MATLAB folosind rutina EasySpin pentru a simula spectrele EPR obținute (din O4, partea 1)

- Simularea spectrelor EPR pentru concentrații scăzute de metale cu un singur tip de MeBPep

- Simularea spectrelor EPR pentru concentrații mari de metale cu un singur tip de MeBPep

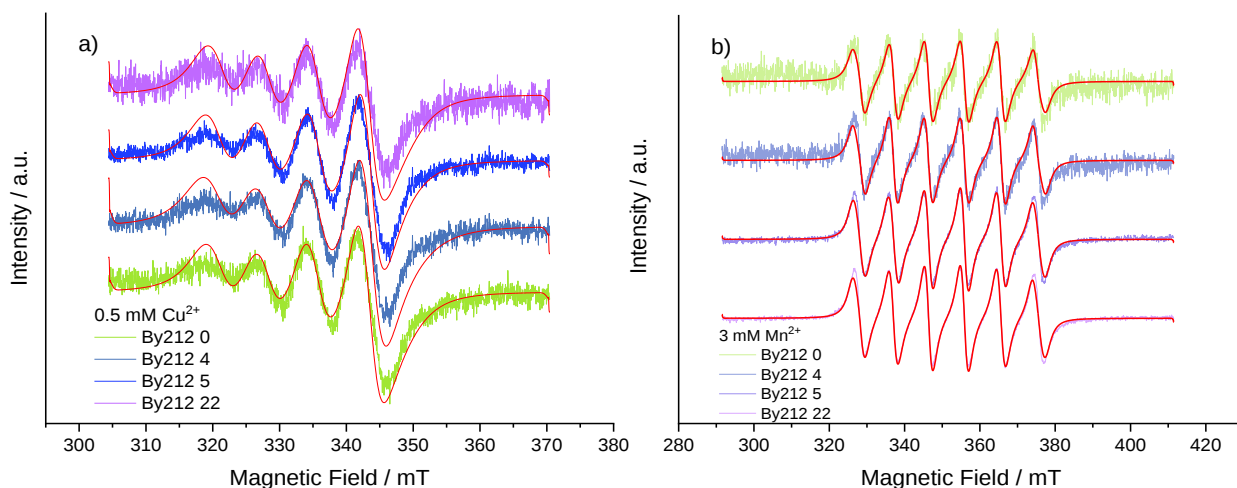


Fig. 8: Spectre EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 în prezența ionilor de Cu²⁺ cu o concentrație de 0.5 mM (a) și de Mn²⁺ cu o concentrație de 3 mM (b) după 30 min de incubare împreună cu spectrele simulate (linii roșii).

Spectrele EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 în prezența ionilor de Cu²⁺ cu o concentrație de 0.5 mM și de Mn²⁺ cu o concentrație de 3 mM au fost simulate și rezultatele sunt prezentate în Figura 8a și respectiv 8b. Simularile au fost făcute cu ajutorul rutinei EasySpin împreună cu un script Matlab prezentat mai jos.

Scriptul Easyspin folosit:

```
data = load('...txt'); B = data(:,1); spc = data(:,5); spc = spc/max(spc); B0 = B/10; Exp.nPoints = 2000;
```

```
Sys1.S = 5/2; Sys1.g = [2.006 2.0037 2.0047]; Sys1.Nucs = 'Mn/Cu'; Sys1.A = 268; Sys1.logtcorr = -11.27; Sys1.lwpp = [0.5 2.1];
```

```
Vary1.g = [0.005 0.005 0.005]; Vary1.A = 20; Vary1.logtcorr = -3;
```

```
Exp.mwFreq = 9.88; Exp.Range = [min(B0) max(B0)]; Exp.ModAmp = 0.3; Exp.Harmonic = 1;
Opt.Method = 'matrix'; Opt.Verbosity = 1; Opt.nKnots = 25; FitOpt.Method = 'simplex fcn';
FitOpt.Scaling = 'lsq0';
```

```
esfit('chili',spc,Sys1,Vary1,Exp,Opt,FitOpt);
```

Rezultatele parametrilor EPR obtinuti dupa simulare sunt prezentate in Tabelul 3, si indica in cazul ionilor de Cu^{2+} un tensor g axiala cu $g = [2.15 \ 2.01]$ o constanta hyperfina $A = [228 \ 56]$ MHz si timpi de corelare de aproximativ 1 ns. In cazul ionilor de Mn^{2+} $g = [2.0055 \ 2.004 \ 2.005]$, $A = 268$ MHzsi timpi de corelare mult mai rapizi de aproximativ 0.01 ns indicand o mobilitate mult mai ridicata a acestor ion comparat cu cei de Cu.

Ioni	Linie celulara	Spin S	Tensor - g	Constanta hiperfina - A	Logtcorr
Cu^{2+}	By212 0	3/2	[2.148 2.0145]	[226 54]	-9.12
	By212 4	3/2	[2.15 2.004]	[231 56]	-9.24
	By212 5	3/2	[2.14675 2.0221]	[228 70]	-9.12
	By212 22	3/2	[2.146 2.01]	[223 47]	-9.09
Mn^{2+}	By212 0	5/2	[2.0056 2.0039 2.0046]	268	-11.27
	By212 4	5/2	[2.0055 2.00382 2.0047]	268	-11.27
	By212 5	5/2	[2.00523 2.004 2.005]	268	-10.84
	By212 22	5/2	[2.00564 2.00415 2.0047]	268	-11.12

Tabel 3: parametrii EPR obtinuti in urma simularii spectrelor EPR obtinute pt linile celulare By212 0, 4, 5, 22 in prezenta ionilor de Cu^{2+} cu o concentratie de 0.5 mM si de Mn^{2+} cu o concentratie de 3 mM dupa 30 min de incubare.

Website

Website-ul proiectului a fost incarcat ai actualizat in platforma.

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

Act 2.1 - Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys ((din O1, partea 2)

Act 2.2 - Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His (din O1, partea 2)

Act 2.3 - 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 2)

Act 2.4 - 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 2)

Act 2.5 - Dezvoltarea unui script MATLAB folosind rutina EasySpin pentru a simula spectrele EPR obținute (din O4, partea 1)

Toate obiectivele propuse au fost realizate

Website

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

Manuscript

Doua manuscrise au fost trimise spre publicare. Un manuscris este în lucru și va fi trimis spre publicare.

Rezumat executiv al activităților realizate în perioada de implementare

Act 2.1 - Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys, Act 2.2 - Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His (din O1, partea 2)

Au fost proiectați primeri pentru introducerea MeBPep bogată în Cys și His 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 plasmactice, 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 *SaII* și introduși în pGREG595 (între situsurile *SpeI* și *SaII*, concomitent cu eliminarea fragmentului myGFP din vector. Prin acest procedeu se înlocuiește fragmentul myrGFP cu myrGFP-MeBSeq. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 a fost transformat cu constructele obținute, obținându-se transformanți pentru toate plasmidele pozitive.

Act 2.3 - 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 2), Act 2.4 - 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 2)

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 au fost incubate în prezenta metalelor esențiale, în acest caz ioni de Cu^{2+} și Mn^{2+} variind timpul de expunere și concentrația.

Pentru a determina condițiile optime de creștere a linilor celulare folosite în prezenta ionilor de Cu^{2+} și/sau Mn^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopică EPR concentrația de ioni de metale și timpii de incubare au fost variați. Au fost analizate diferite concentrații de Cu și/sau Mn la diferiți timpi de incubare. Timpii de incubare de 30 de minute și concentrații de Cu sub 1 mM s-au dovedit a cele mai favorabile pt spectroscopia EPR. În cazul ionilor de Mn nu a putut fi stabilită o limită superioară a concentrației de Mn asimilată de celule ei nefiind toxici, ca și cei de Cu, pt liniile celulare folosite.

Act 2.5 - Dezvoltarea unui script MATLAB folosind rutina EasySpin pentru a simula spectrele EPR obținute (din O4, partea 1)

A fost dezvoltat un script Matlab pt simularea spectrelor EPR a ionilor de Cu^{2+} și Mn^{2+} pentru toate liniile celulare propuse. Prin simularea spectrelor EPR s-au putut determina cu o mai mare exactitate parametrii EPR a ionilor de metale folosiți și mobilitatea acestora, stabilindu-se că ei au fost incorporați în celule.