

MGCTVSTQTISKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGDATYGKLTCLKFICTTGKL
PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVIYIMADKOKNGIKVNFKIRHNIEDGSV

QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSAISKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDEL-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)

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 GCAACAGCAACAGCAACA ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys6	GTCGAC: situs SalI TCA codon STOP
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAGCAACA ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys8	
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAGCAACA ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys9	
AAGTCGAC TCA GCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACA ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Cys10	
AAGTCGAC TCA GCAATCGCAATCGCAATC ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysAsp)3	
AAGTCGAC TCA GCAATCGCAATCGCAATCGCAATC ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysAsp)4	
AAGTCGAC TCA GCAATCGCAATCGCAATCGCAATCGCAATC ATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysAsp)5	
AAGTCGAC TCA GCATTTCGATTTCGCATT CATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysGlu)3	
AAGTCGAC TCA GCATTTCGATTTCGCATTTCGCATT CATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysGlu)4	
AAGTCGAC TCA GCATTTCGATTTCGCATTTCGCATTTCGCATT CATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(CysGlu)5	

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

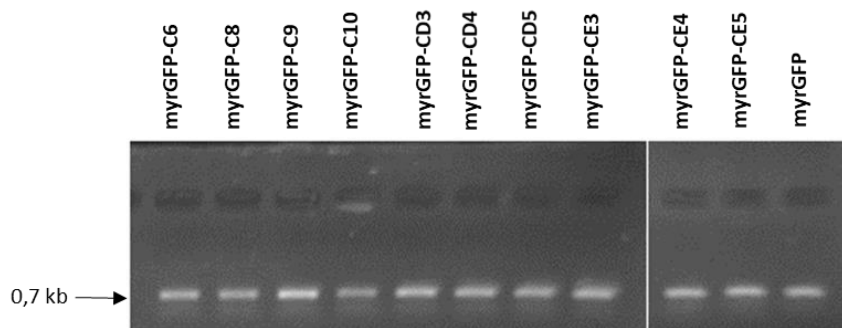


Fig. 2. Electroforegrama ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (Cys-rich) obținuți prin PCR.

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 procedeul TA cloning (Thermo Fisher, Invitrogen) pentru subclonări ulterioare în vectori de interes.

În paralel, ampliconii purificați au fost clivați cu restricțazele *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-myrGFP-MeBSeq.

Au fost obținute clone pozitive pentru pGREG596Δ-myrGFP-C6, pGREG596Δ-myrGFP-C8, pGREG596Δ-myrGFP-C9 și pGREG596Δ-myrGFP-C10 (Figura 3), pGREG596Δ-myrGFP-CE3, pGREG596Δ-myrGFP-CE4.

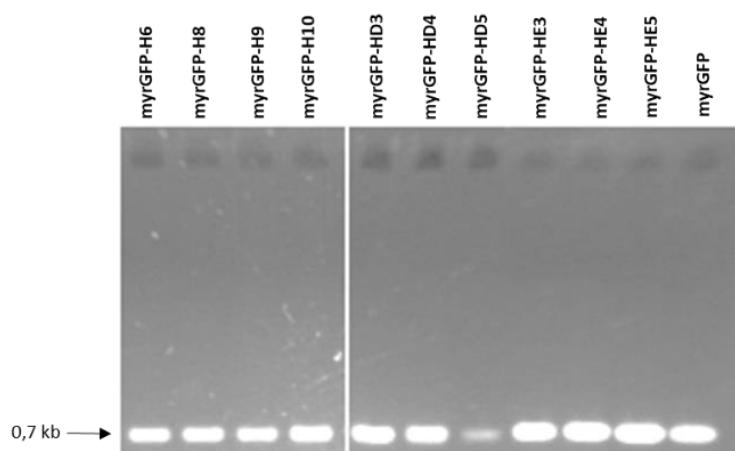


Fig. 3. Electroforegrama fragmentelor obținute la verificarea clonării corecte a ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq în pGREG596. Ampliconii și pGREG596 u fost clivați cu *SpeI* + *SalI*, fragmentele a fost ligate cu ADN ligaza, amestecul de ligare fiind utilizat pentru transformarea celulelor competente 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*. 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.

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

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 ATCGTGATCATGATCGTGATCATGATCGTGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisAsp)5	
AAGTCGAC TCA TTCTGTGTTTCATGTTCTGTGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisGlu)3	
AAGTCGAC TCA TTCTGTGTTTCATGTTCTGTGTTTCATGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisGlu)4	
AAGTCGAC TCA TTCTGTGTTTCATGTTCTGTGTTTCATGTTCTGTGATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	(HisGlu)5	

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

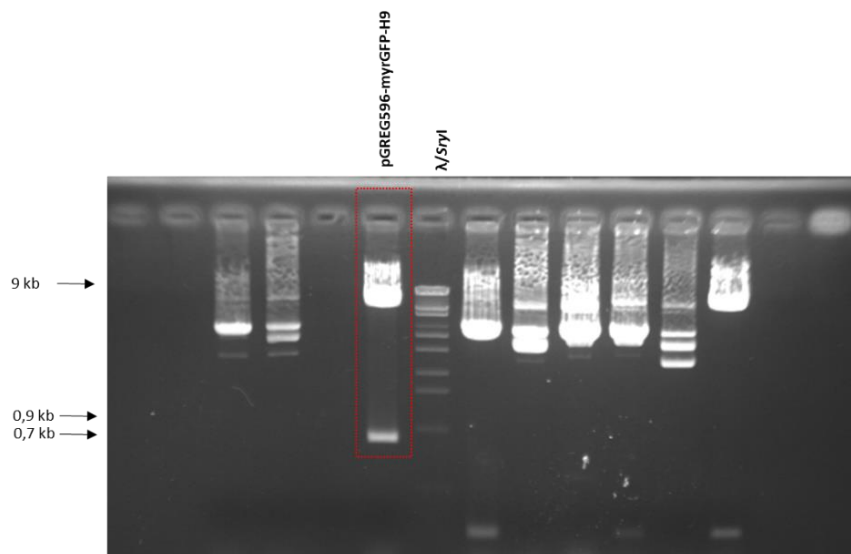


Fig. 4. Electroforegrama ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (His-rich) obținuți prin PCR și clonați în vectorul pGREG596.

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 *SaII* și introduși în pGREG595 (între situsurile *SpeI* și *SaII*, concomitent cu eliminarea fragmentului myGFP din vector (Figura 5). Prin acest procedeu se înlocuiește fragmentul myrGFP cu myrGFP-MeBSeq, rezultând pGREG596Δ-myrGFP-MeBSeq.

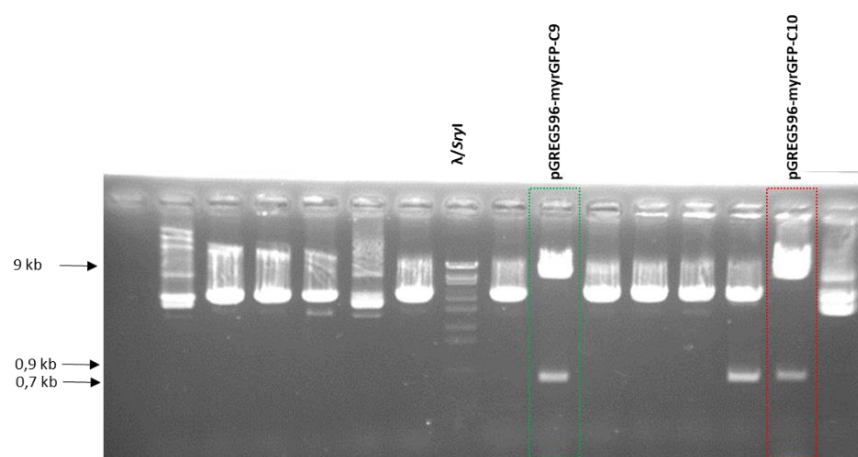


Fig. 5. Electroforegrama fragmentelor obținute la verificarea clonării corecte a ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (His rich) obținuți prin PCR și clonați în pGREG596. Ampliconii și pGREG596 au fost clivați cu *SpeI* + *SaII*, fragmentele au fost ligate cu ADN ligaza, amestecul de ligare fiind utilizat 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* + *SaII*. Chenarul roșu/chenarul verde indică un rezultat pozitiv.

Au fost obținute clone pozitive pentru pGREG596Δ-myrGFP-H6, pGREG596Δ-myrGFP-H8, pGREG596Δ-myrGFP-H9 (Figura 9) și pGREG596Δ-myrGFP-H10.

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

Primer anti-sense	Secvența introdusă	Obs.
AAGTCGAC TCA ATCGTCATCGTCATCGTC TAGTTTCATCCATGCCATGTGT	Asp6	GTCTGAC: situs <i>Sall</i> TCA codon STOP
AAGTCGAC TCA ATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Asp8	
AAGTCGAC TCA ATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Asp9	
AAGTCGAC TCA ATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATCGTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Asp10	
AAGTCGAC TCA TTCTCTTCTCTTCTCTCTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Glu6	
AAGTCGAC TCA TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Glu8	
AAGTCGAC TCA TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Glu9	
AAGTCGAC TCA TTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTCATGTGTAATCCCAGCAGCTGT	Glu10	

myrGFP-D6	myrGFP-D8	myrGFP-D9	myrGFP-D10	myrGFP-E6	myrGFP-E8	myrGFP-E9	myrGFP-E10	myrGFP
								

T2. Fuzionarea ampliconilor cu fragmente de ADN în vectori fungici.

În paralel, ampliconii purificați au fost clivați cu restricțazele *SpeI* și *Sall* și introduși în pGREG595 (între situsurile *SpeI* și *Sall*, concomitent cu eliminarea fragmentului myGFP din vector (**Figura 7**). Prin acest procedeu se înlocuiește fragmentul myrGFP cu myrGFP-MeBSeq, rezultând pGREG596Δ-myGFP-MeBSeq.

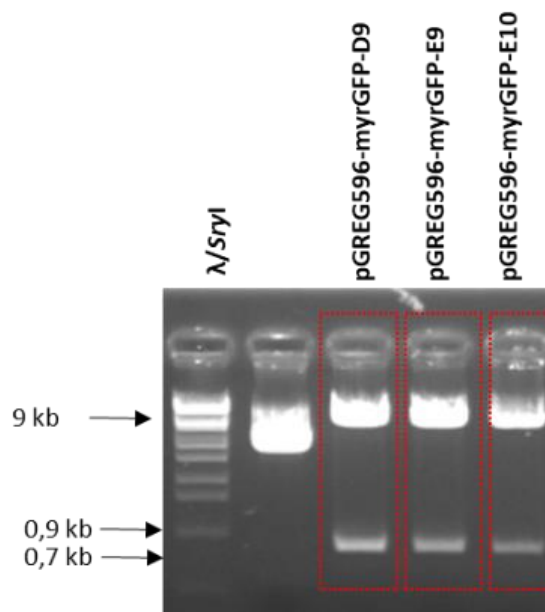


Fig. 7. Electroforegrama fragmentelor obținute la verificarea clonării corecte a ampliconilor de tip myrGFP-MeBSeq (carboxi-rich) obținuți prin PCR în pGREG596. Ampliconii și pGREG596 au fost clivați cu *SpeI* + *SalI*, fragmentele au fost ligate cu ADN ligaza, amestecul de ligare fiind utilizat pentru 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*. Chenarul roșu indică un rezultat pozitiv.

Au fost obținute clone pozitive pentru pGREG596Δ-myrGFP-D6, pGREG596Δ-myrGFP-D8, pGREG596Δ-myrGFP-D9 (Figura 9) și pGREG596Δ-myrGFP-E6, pGREG596Δ-myrGFP-E8, pGREG596Δ-myrGFP-E9 (Figura 9) și pGREG596Δ-myrGFP-E10 și (Figura 9).

T3. Transformarea drojdiei cu constructele obținute.

Au fost obținuți transformanți pentru toate plasmidele pozitive.

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

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 metalici 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 crestere YPD si au fost incubate din nou la 28 °C 150 de rotații pe minut timp de 1.5 ore, timp care reprezinta 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 optica (DO) care indica 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 optima a celulelor. Pentru toate liniile celulare s-au efectuat 6 măsurători diferite.

Tabel 1 Turbiditatea suspensiilor celulare determinata prin spectroscopie UV-vis (600 nm) a celor 4 linii celulare înainte de incubare în prezenta metalelor esențiale. O valoare a turbidității egală cu 0,1 corespunde unde densități celulare de aproximativ 10^6 celule/mL.

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 obtinute mai sus au fost ulterior expuse unei concentrații de 2 mM ioni de Mn^{2+} , pentru care s-au folosit 2 mL de suspensie celulara obținuta mi sus la care s-a adaugat $MnCl_2$ în concentrația dorita. Celule 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, si indica o creștere normala a celulelor, evidențiind caracterul non toxic a concentrației de Mn.

Tabel 2 Turbiditatea suspensiilor celulare 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) si
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)

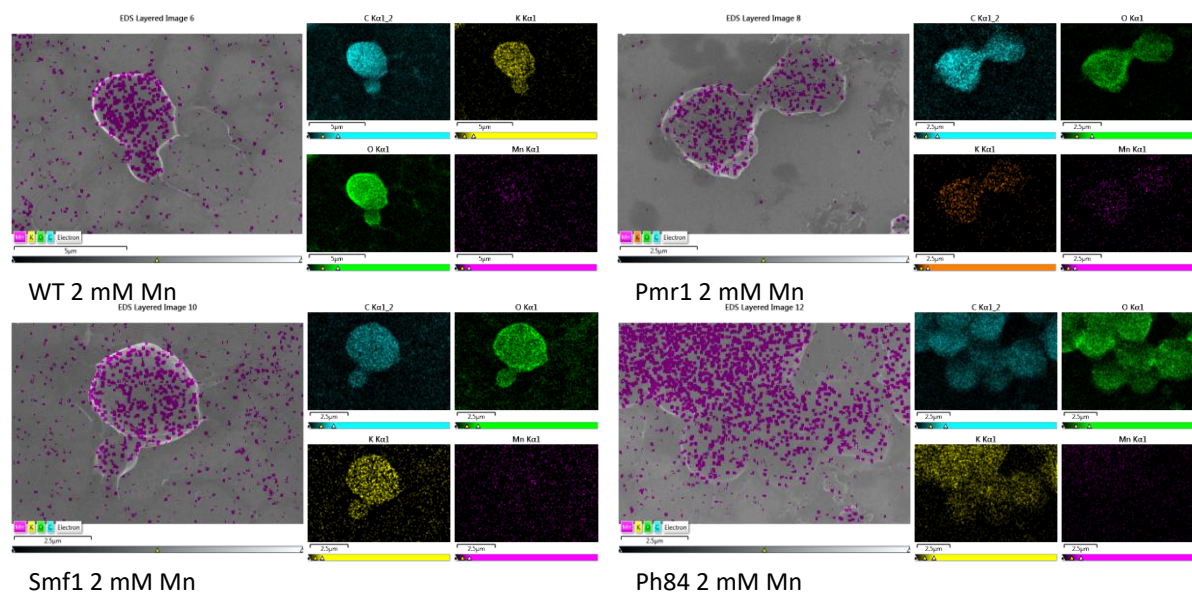


Fig.8 Imagine TEM a liniilor celulare WT, PMR1, SMF1 si PH84 impreuna cu maparea elementelor principale C, K, O si Mn.

Culturile de culele *WT*, *PMR1*, *SMF1* si *PH84* au fost incubate in prezenta metalelor esențiale, in acest caz ioni de Mn^{2+} , variind timpul de expunere si 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 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 Mn^{2+} din soluție.

Măsurătorile efectuate prin microscopia electronica prin transmisie (TEM) împreuna cu EDS si mapping (Figura 8) arata ca ionii de Mn^{2+} ramași sunt legați / acumulați in celule, fiind eliminați cei nelegați ramași in 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 (linia parentală) și liniile knockout *pmr1Δ*, *smf1Δ* si *pho84Δ* (defective în genele *PMR1*, *SMF1* si respectiv *PHO84*) in prezenta ionilor de Mn^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopica EPR concentrația de Mn si timpii de incubare au fost variați. Au fost analizate doua concentrații de Mn 0.25 si 0.5 mM cu timpii de incubare de 60 min, 4 ore si 24 ore respectiv 20, 40, 60 si 90 minute. 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 9.

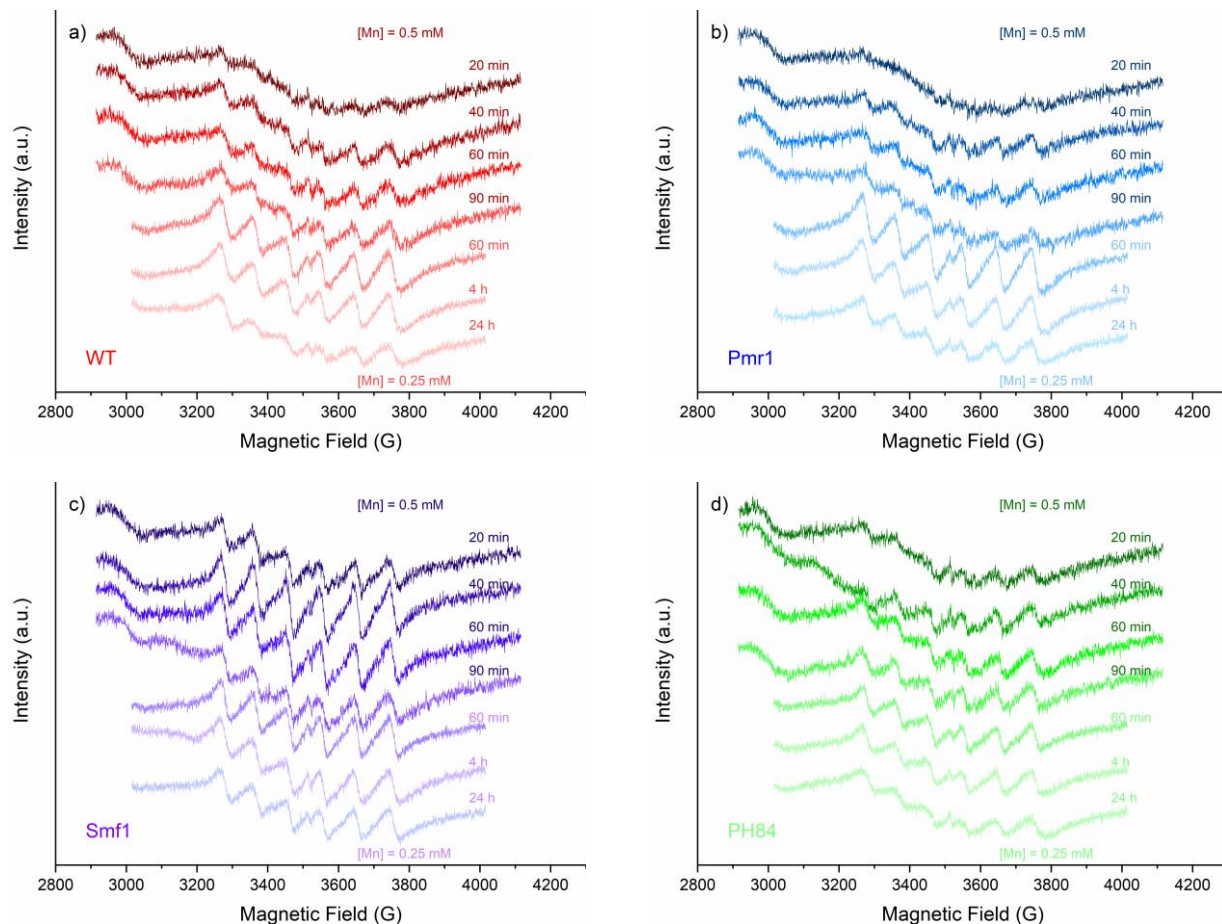


Fig. 9 Spectre EPR a linilor celulare WT (a), *pmr1Δ* (b), *smf1Δ* (c) si *pho84Δ* (d) în prezența a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații de 0.25 si 0.5 mM după diferiți timpi de incubare.

Spectrele EPR din Figura 9 indica o mai buna 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 în celule probabil datorat timpilor foarte scurți de incubare si a concentrației mai ridicate de ioni de Mn care poate inhiba creșterea celulara.

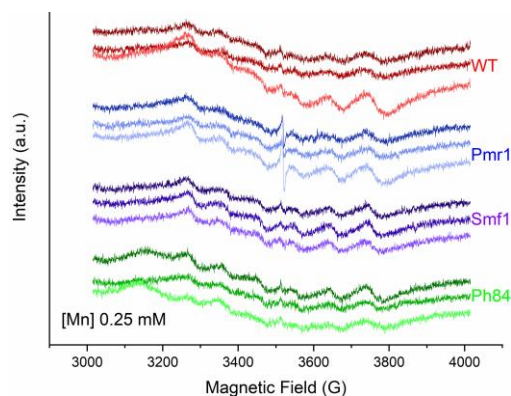


Fig. 10 Spectre EPR a linilor celulare WT, *pmr1Δ*, *smf1Δ* si *pho84Δ* în prezența ionilor de Mn^{2+} cu o concentrație de 0.25 mM după ora de incubare.

Pentru a determina replicabilitatea experimentelor fiecare linie celulara a fost crescuta în 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 în Figura 10 arata o foarte buna stabilitate a metodelor folosite pentru creșterea si incubarea celulelor în prezența 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 (linia parentală) și liniile knockout *pmr1Δ*, *smf1Δ* și *pho84Δ* (defective în genele *PMR1*, *SMF1* și respectiv *PHO84*).

T2. Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale și **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 (linia parentală) și liniile knockout *pmr1Δ*, *smf1Δ* și *pho84Δ*, 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 în [Figura 11](#). Semnalul EPR a celor 4 linii celulare în prezența ionilor de Mn cu o concentrație mai mică sau egală cu 1 mM are o intensitate similară. Intensitatea semnalului EPR pentru concentrații de Mn de 0.5, 0.75 și 1 mM are aceiași intensitate, contrar așteptărilor unde semnalul ar trebui să crească linear cu concentrația de Mn, 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.

În [Figura 12](#) sunt prezentate spectrele EPR a liniilor celulare WT (linia parentală) și liniile knockout *pmr1Δ*, *smf1Δ* și *pho84Δ* în prezența ionilor de Mn^{2+} cu concentrații între 0 și 2 mM. Timpul de incubare în acest caz a fost de 1 ora. Se observă o creștere semnificativă a semnalelor EPR a ionilor de Mn^{2+} chiar și la concentrații mici de 0.5 mM în comparative cu semnalele observate în [Figura 11](#), unde la aceste concentrații semnalul EPR era mult mai mic, indicând o acumulare în timp la nivel celular a ionilor de metal.

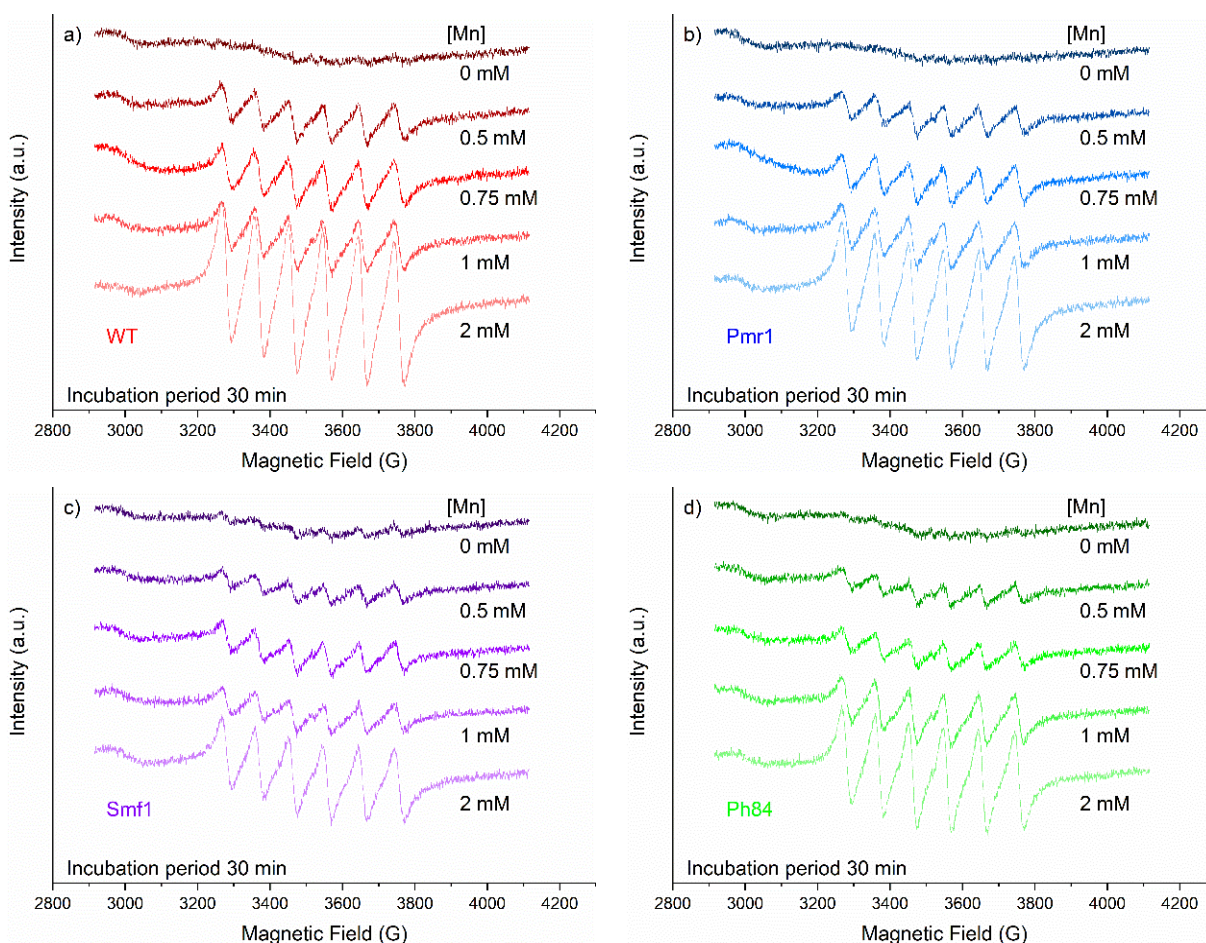


Fig. 11 Spectre EPR a liniilor celulare WT (a), *pmr1Δ* (b), *smf1Δ* (c) și *pho84Δ* (d) în prezența a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații variind de la 0 la 2 mM după 30 de minute de incubare.

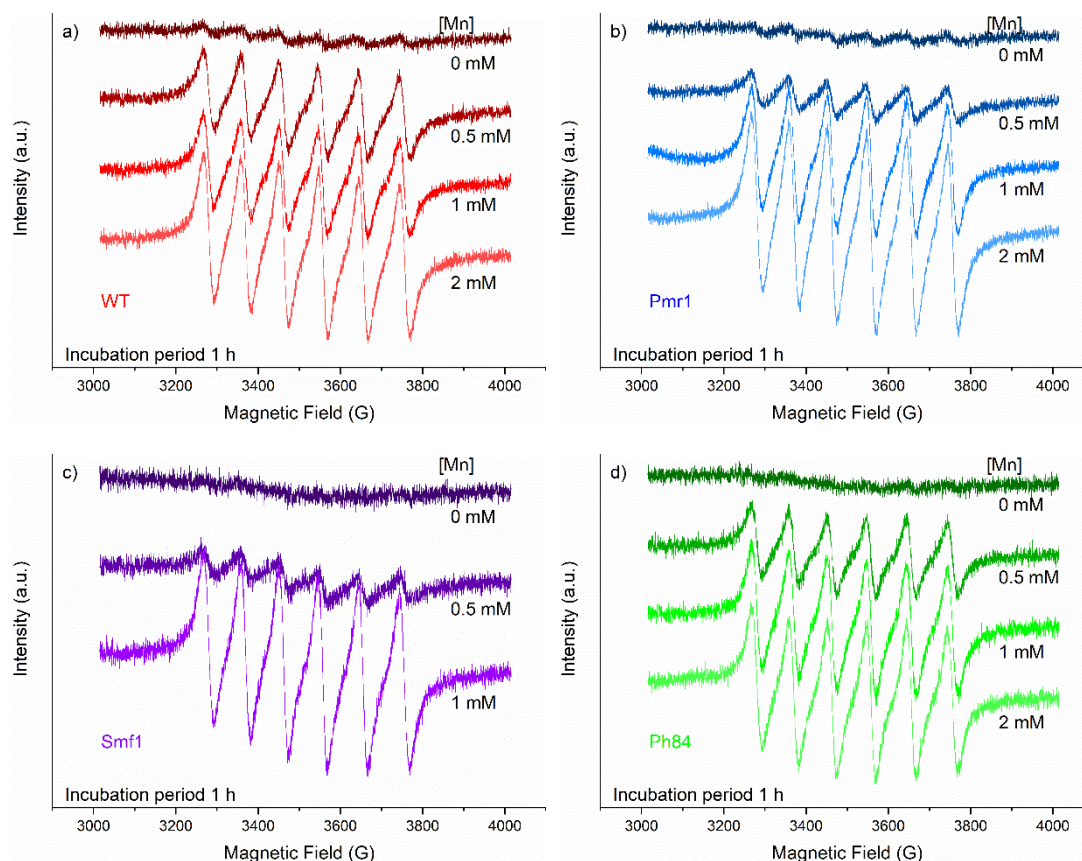


Fig. 12 Spectre EPR a liniilor celulare WT (a), *pmr1Δ* (b), *smf1Δ* (c) si *pho84Δ* (d) in prezenta a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații variind de la 0 la 2 mM după 1 ora de incubare.

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

Concentrațiile de ioni de Mn^{2+} (≤ 2 mM) folosite in tratamentul liniilor celulare WT (linia parentală) și liniile knockout *pmr1Δ*, *smf1Δ* si *pho84Δ* s-au dovedit a fi netoxice, obținându-se colonii de celule viabile chiar si după incubări de 24 de ore in prezenta ionilor metalici. In măsurătorile planificate in etapa următoare a proiectului v-or fi folosite si concentrații mai mari pentru stabilirea celei mai mari concentrații netoxice pentru fiecare tulpina.

A2.1 Proiectarea și clonarea MeBP bogat în Cys ((din O1, para 2)

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

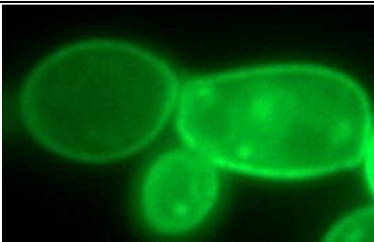
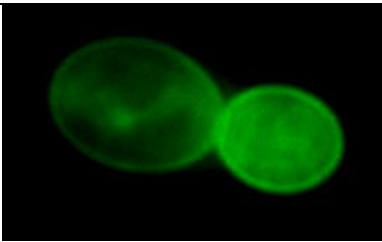
În etapa anterioară s-au obținut plasmide ADN care conțin caseta myrGFP marcată la capătul C-terminal cu secvențe de aminoacizi cu conținut mare de cisteină (Cys/C). Celulele de *Saccharomyces cerevisiae* transformate cu plasmidele respective ar trebui să exprime variante de GFP ancorate de fața internă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

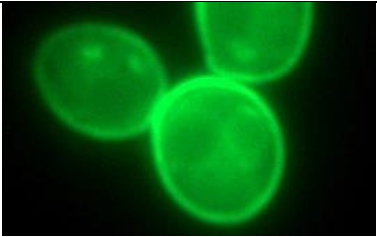
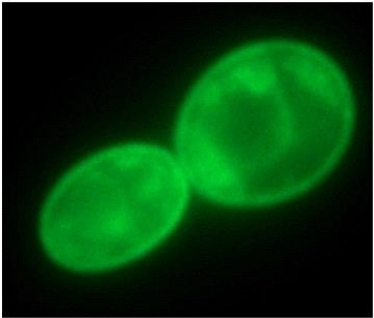
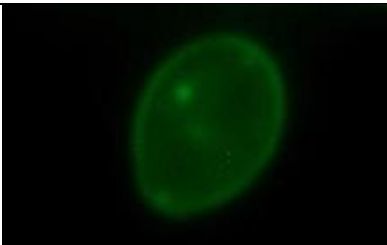
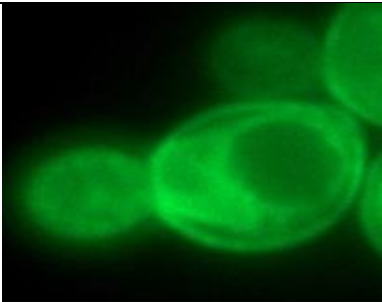
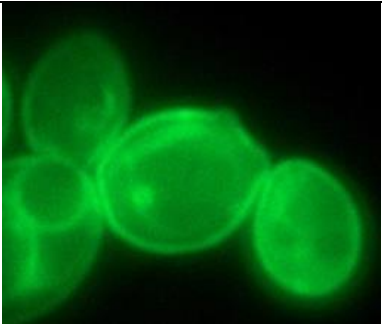
MGCTVSTQTISKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKL
PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDEL-
CysRichSeq*,

unde secvența evidențiată în galben este secvența semnal pentru miristoilare (care permite ancorarea de fața interă a membranei plasmactice), 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 3)

Tabel 3. 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 13](#))

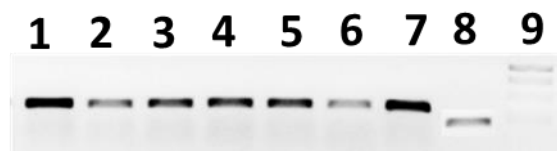


Fig. 13 Analiza prin *western blot* a exprimării myr-GFP-CysRichSeq. 1: Cys6; 2: Cys8; 3: Cys9; 4: Cys10; 5: (CysAsp)3; 6: (CysAsp)5; 7: (CysGlu)5; 8: non-tagged GFP; 9: marker. Celulele de *S. cerevisiae* transformate cu plasmidele corespunzătoare au fost crescute pe mediu selectiv (SD-Ura) înainte de a fi recoltate pentru obținerea proteinelor totale. Proteinele totale din fiecare linie celulară au fost separate prin SDS-PAGE apoi amprintate pe o membrană PVDF. Anticorp primar: anticorp anti-GFP (iepure). Anticorp secundar: anticorp-anti IgG iepure marcat ECL.

A2.2 Proiectarea și clonarea MeBP bogat în His (din O1, para 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

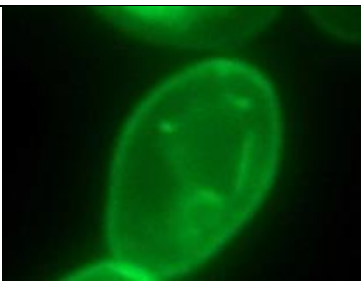
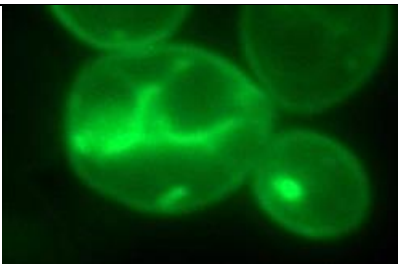
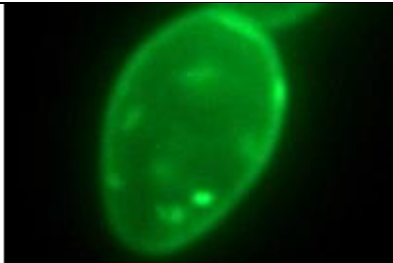
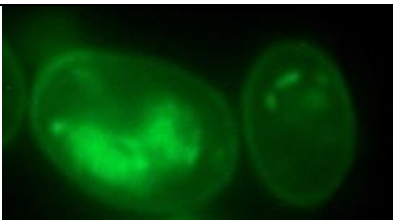
MGCTVSTQTISKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKL
PVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVK
FEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLTQSAISKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITTHGMDEL-
HisRichSeq*,

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 4](#))

Tabel 4. 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 14).



Fig. 14. 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).

A2.3 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)

T3 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 prezența 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 timpi 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 15 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 timpi de incubare și concentrații mai ridicate, liniile celulare s-au dovedit a fi foarte sensibile, ele nerezistând expunerii la ionii de Cu^{2+} .

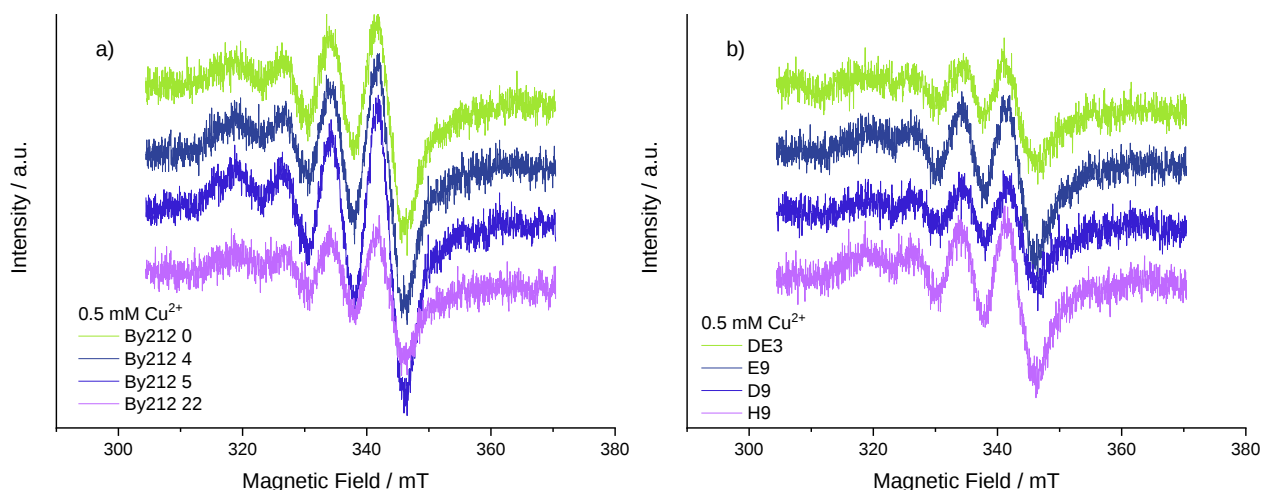


Fig. 15: Spectre EPR a liniilor celulare By212 0, 4, 5 si 22 (a) si DE3, E9, D9 si H9 (b) in prezenta a ionilor de Cu^{2+} cu concentrații de 0.5 mM după 30 min de incubare.

Spectrele EPR din Figura 3 indica o mai buna asimilare a ionilor de Cu^{2+} cu o concentrație de 0.5 mM după timpi de incubare scurți de aproximativ 30 min. La concentrații si timpi de incubare mai mari semnalul EPR nu a putut fi detectat, indicând ca ionii de Cu^{2+} au inhibat creșterea celulara.

T4 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 si DE3, E9, D9, H9 au fost incubate in prezenta metalelor esențiale, in acest caz ioni de Mn^{2+} , variind concentratia. 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 spală. 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 si DE3, E9, D9, H9 in prezenta ionilor de Mn^{2+} pentru a fi analizate prin metoda spectroscopica EPR concentrația de Mn a fost variata. Au fost analizate doua concentrații de Mn 1 si 3 mM cu timpi de incubare de 30 min. După incubare toate probele au fost spălate cu procedura descrisa mai sus, iar pentru măsurători s-au folosit 30 μL de celule. Aceste prime rezultate sunt prezentate in [Figura 16](#) unde sunt arătate spectrele liniilor celulare menționate mai sus in prezenta unei concentrații de Mn de 1 si 3 mM si timp de incubare de 30 min. Semnalul specific ionilor de Mn^{2+} este vizibil la ambele concentrații in cazul tuturor liniilor celulare. La o concentratie de 1 mM Mn nu sunt evidente schimbari in semnalul EPR indicand ca toate liniile asimileaza ionii de Mn^{2+} in aceeasi proportie. La cresterea concentratie de Mn la 3 mM, sunt observabile diferente in intensitatea semnalului EPR, indicand ca linia By212 5 asimileaza cea mai ridicata concentratie de Mn^{2+} .

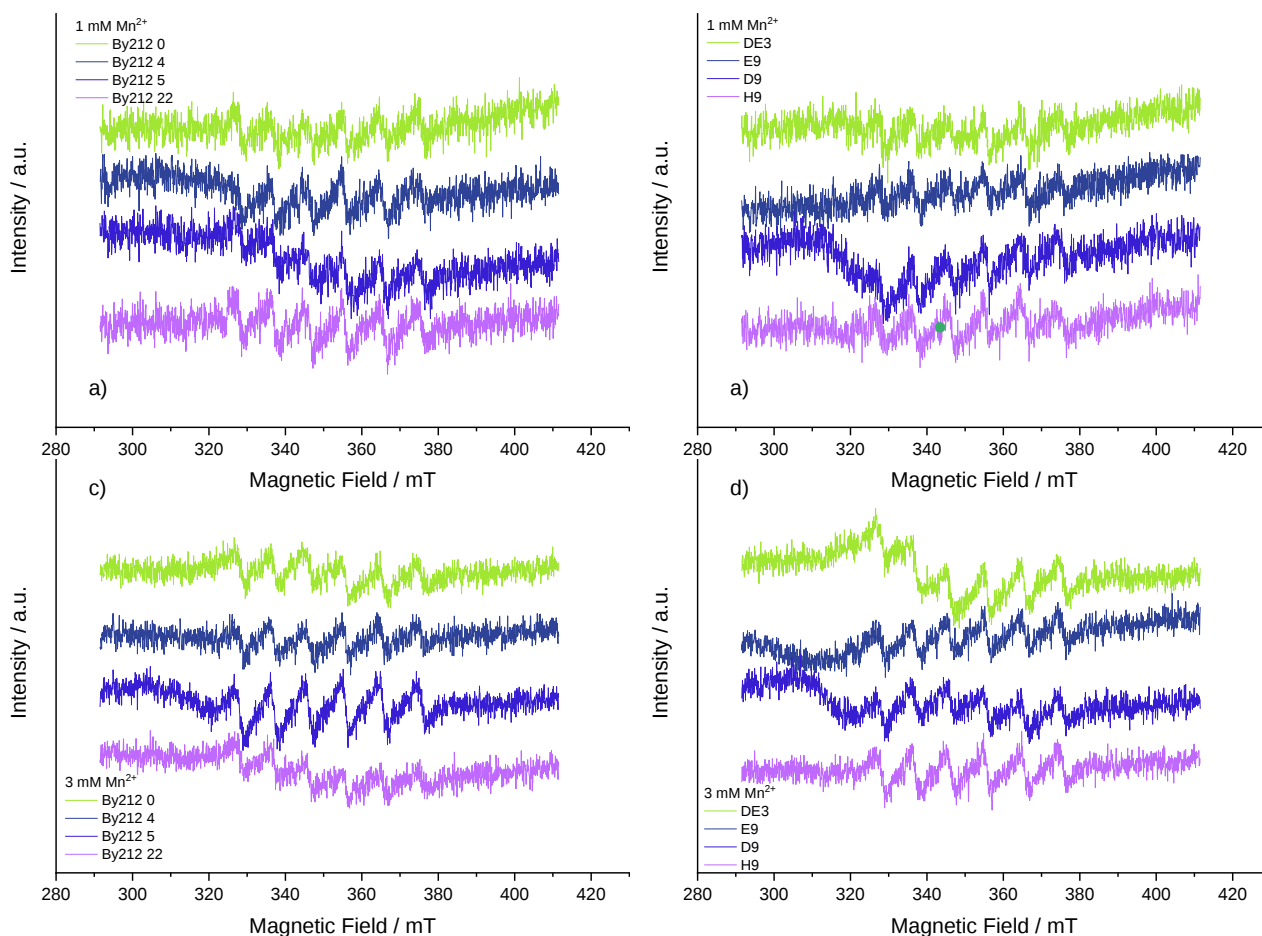


Fig. 16 Spectre EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 (a, c) si DE3, E9, D9 si H9 (b, d) in prezenta a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații de 1 mM respectiv 3 mM după 30 min de incubare.

T5 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 si DE3, E9, D9, H9 au fost incubate in prezenta metalelor esențiale, in acest caz ioni de Mn^{2+} si Cu^{2+} in 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 reziduala a fost îndepărtata si 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 Cu^{2+} din soluție. După spălare celule obținute in cele 3 serii diferite au fost combinate, astfel concentrația de celule expuse la metale a fost imbunatatita.

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 concentratie determinata 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.

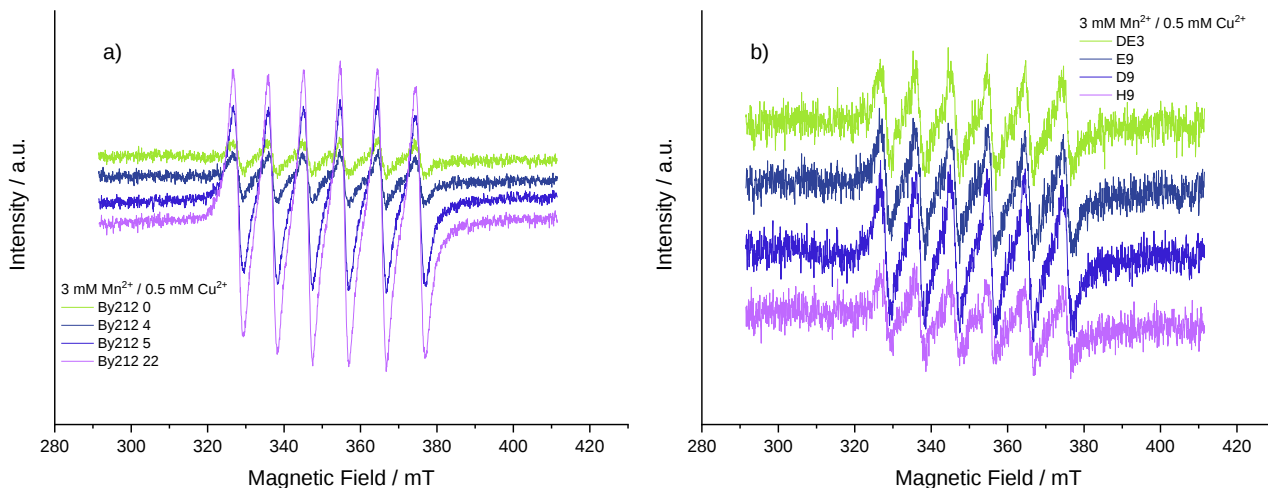


Fig. 17: Spectre EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 (a) si DE3, E9, D9 si H9 (b) in prezenta a ionilor de Mn^{2+} cu o concentrație de 3 mM si a ionilor de Cu^{2+} o concentrație de 0.5 mM după 30 min de incubare.

T6 Integrarea datelor. Corelația cu datele de acumulare a metalelor. Corelația cu localizarea celulară a GFP-MeBP.

Vezi Activitatea 2.5.

A2.4 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)

T7 Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu $Cu(II)$ în concentrație mare, dar netoxică.

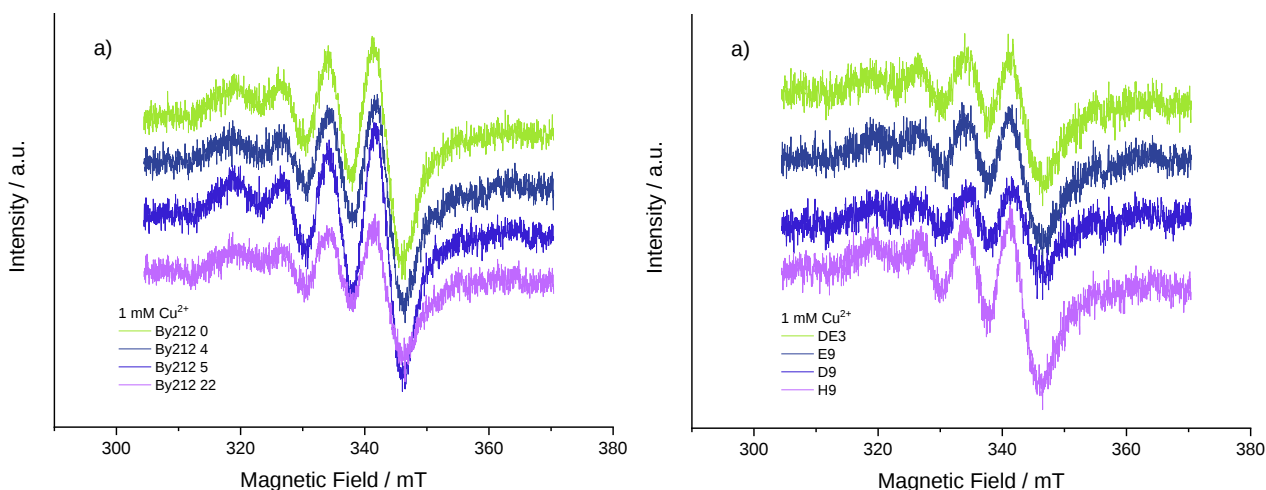


Fig. 18 Spectre EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5 si 22 (a) si DE3, E9, D9 si H9 (b) in prezenta a ionilor de Cu^{2+} cu concentrații de 1 mM după 30 min de incubare.

Culturile de culele By212 0, 4, 5, 22 si DE3, E9, D9, H9 au fost incubate in prezenta metalelor esențiale, in acest caz ioni de Cu^{2+} , 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 spăla. Acest proces a fost repetat de 3 ori pentru a asigura îndepărtarea tuturor ionilor de Cu^{2+} din soluție.

Având în vedere sensibilitatea liniilor celulare By212 0, 4, 5, 22 și DE3, E9, D9, H9 în prezența ionilor de Cu^{2+} pentru a putea fi analizate prin metoda spectroscopică EPR o singură concentrație de 1 mM de Cu a fost utilizată cu timpi scurți 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 18 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 ioni de Cu^{2+} .

Spectrele EPR din Figura 18 indică o bună asimilare a ionilor de Cu^{2+} 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 ioni de Cu^{2+} au inhibat creșterea celulară. Toate spectrele prezintă un semnal EPR specific Cu^{2+} în soluție, neputând fi identificate diferențe între cele 8 linii celulare, Cu^{2+} fiind asimilat și complexat în aceeași măsură.

T8 Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu Mn(II) în concentrație mare, dar netoxică.

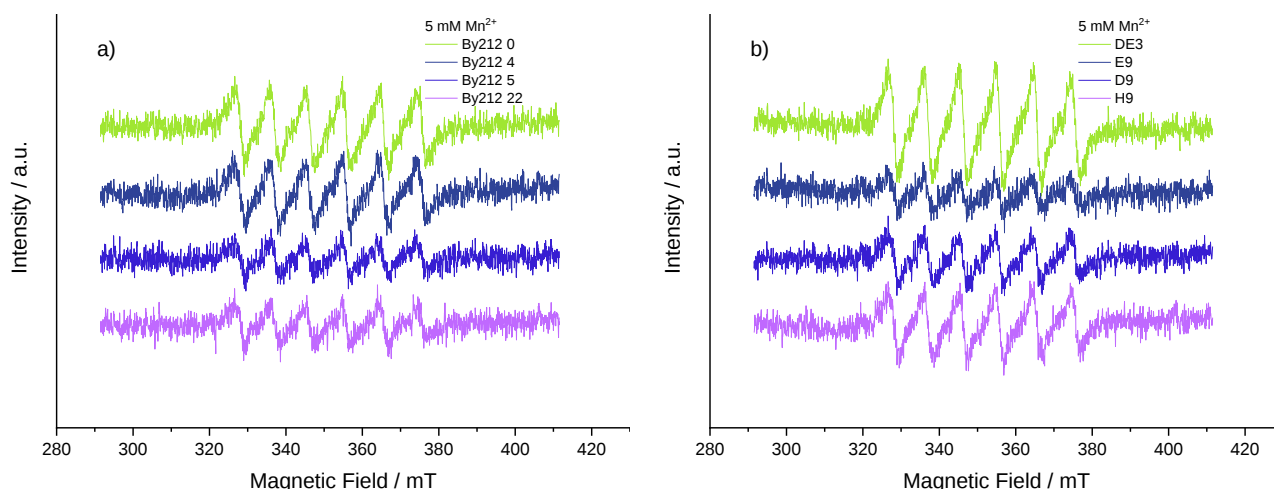


Fig. 19 Spectre EPR a liniilor celulare By212 0, 4, 5 și 22 (a) și DE3, E9, D9 și H9 (b) în prezența a ionilor de Mn^{2+} cu concentrații de 5 mM după 30 min de incubare.

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+} , cu o concentrație ridicată 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 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 o singură concentrație de Mn de 5 mM a fost utilizată 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 μL de celule. Aceste prime rezultate sunt prezentate în Figura 19a unde sunt arătate spectrele liniilor celulare menționate mai sus în prezenta unei concentrații de Mn de 5 mM și timp de incubare de 30 min. Semnalul specific ionilor de Mn^{2+} este vizibil în cazul tuturor liniilor celulare. La o concentrație de 5 mM Mn în cazul liniei By212 (Figura 19a) nu sunt evidente schimbări în semnalul EPR indicând ca toate liniile asimilează ionii de Mn^{2+} în aceeași proporție. În Figura 19b sunt observabile diferențe în intensitatea semnalului EPR, indicând ca linia DE3 asimilează cea mai ridicată concentrație de Mn^{2+} urmată de H9.

T9 Profilarea EPR a celulelor crescute în medii epuizate de urme de metale, dar suplimentate cu alți ioni paramagnetici în concentrații mari, dar netoxice.

În acest caz s-a încercat utilizarea a 5mM Mn^{2+} în combinație cu 1 mM Cu^{2+} . În urma măsurătorilor EPR nu a putut fi detectat nici un semnal, indicând ca liniile celulare nu au rezista acestor concentrații de ioni de metale, toxicitatea lor fiind prea mare.

T10 Integrarea datelor. Corelația cu datele de acumulare a metalelor. Corelația cu localizarea celulară a GFP-MeBP.

Vezi Activitatea 2.5.

A2.5 Dezvoltarea unui script MATLAB folosind rutina EasySpin pentru a simula spectrele EPR obținute (din O4, partea 1)

Si

A3.1 Dezvoltarea unui script MATLAB folosind rutina EasySpin pentru a simula spectrele EPR obținute - Simularea spectrelor EPR pentru concentrații scăzute de metale cu diferite tipuri de MeBPep

T11 Simularea spectrelor EPR pentru concentrații scăzute de metale cu un singur tip de MeBPep

T12 Simularea spectrelor EPR pentru concentrații mari de metale cu un singur tip de MeBPep

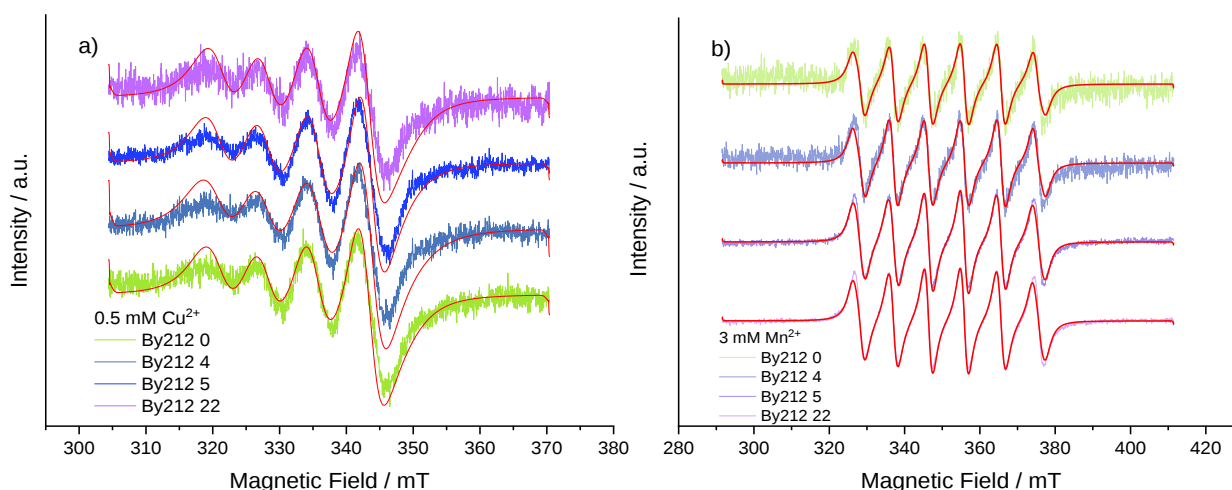


Fig. 20: Spectre EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 in prezenta ionilor de Cu^{2+} cu o concentrație de 0.5 mM (a) si de Mn^{2+} cu o concentrație de 3 mM (b) după 30 min de incubare împreuna cu spectrele simulate (linii roși).

Spectrele EPR a linilor celulare By212 0, 4, 5, 22 in prezenta ionilor de Cu^{2+} cu o concentrație de 0.5 mM si de Mn^{2+} cu o concentrație de 3 mM au fost simulate si rezultatele sunt prezentate in Figura 20a si respectiv 20b. Simularile au fost facute cu ajutorul rutinei EasySpin impreuna 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 5, si indica in cazul ionilor de Cu^{2+} un tensor g axiala cu $g = [2.15 \ 2.01]$ o constanta hiperfina $A = [228 \ 56]$ 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 5: 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 concentrație de 0.5 mM si de Mn^{2+} cu o concentrație de 3 mM după 30 min de incubare.

Toate obiectivele propuse au fost realizate

Website

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

<https://www.itim-cj.ro/PNCIDI/mebpepepr/>

Articole publicate sau in curs de publicare:

Un articol a fost publicat: 10.3390/ijms242417137

Un manuscris a fost trimis spre publicare la jurnalul: ACS Sustainable Chemistry & Engineering

Un manuscris este in lucru si v-a fi trimis spre publicare (ACS Biomaterials Science & Engineering).

Comunicari stiintifice:

14th International Conference on Physics of Advanced Materials - Electron Paramagnetic Resonance fingerprinting of yeast cells overexpressing metal-binding peptides.

Processes in Isotopes and Molecules - Electron Paramagnetic Resonance fingerprinting of yeast cells with defective heavy metal accumulation

Toti indicatorii de rezultat au fost atinsi.

Impact: Protocoalele de clonare a myrGFP-MeBSe si a MeBP bogat în Cys si His, generarea de constructe bogate în aminoacizi carboxilați, si identificarea condițiilor adecvate pentru prepararea culturilor de drojdie pentru spectroscopie EPR obtinute in acest studiu reprezinta un punct de pornire solid pentru viitoare proiecte de cercetare. Rutinele de simulare a spectrelor EPR o sa fie folosite in viitor pentru a identifica specile de metale complexate de diferite tulpini de drojdii.

Director Proiect,

Rostas Arpad Mihai

