ABSTRACTUL TEZEI DE DOCTORAT

Elaborată de ing.PETRES JUDIT

Teza de doctorat, cu titlul **„Studiul obţinerii proteinelor fluorescente cu sensibilitate ridicată la metale tranziţionale”**, prezintă obţinerea unor proteine modificate genetic cu proprietăţi fotofizice îmbunătăţite ale căror sensibilitate faţă de variaţiile concentraţiilor componentului analizat se află în gama nanomolară. Lucrarea ştiinţifică este dezvoltată pe două paliere. În primul rând se realizează un studiu teoretic despre proteinele fluorescente şi despre aplicaţiile posibile ale acestora, precum şi despre aspecte teoretice ale analizelor fluorescenţei. Partea experimentală cuprinde modificarea genelor care codifică proteina fluorescentă verde izolată din *Aequora victoria*, producerea proteinelor modificate şi caracterizarea lor spectrale. În acest mod au fost realizate proteine mutante conţinând situsurile de legare create din histidine în apropierea cromoforului (EGFP/2H). În unele forme ale acestor proteine s-au mai creat situsurile de legare periferice prin fuzionarea secevenţelor conţinând de asemenea histidine (EGFP/h2H) sau cisteina (EGFP/h2Hc). Analizele proprietăţilor fotofizice şi fotochimice au condus la concluzia că proteina EGFP/h2Hc are o afinitate extrem de ridicată faţă de ionii de cupru. Astfel, datorită sensibilităţii nanomolare şi a faptului că genele sale pot fi introduse şi evidenţiate într-un organism dat fără a-şi pierde structura specifică, se recomandă pentru a fi utilizată la monitorizarea ionilor de cupru în mediul celular. Mai departe a fost propusă investigarea cauzelor sensibilităţi nanomolare prin combinarea metodelor experimentale cu modelarea moleculară. Conform rezultatelor actuale, se poate constata că a fost determinată în premieră magnitudinea torsiunii inelului fenolat din cromoforul proteinei EGFP/h2Hc fiind saturată cu ionii de cupru.

PhD thesis, entitled “**Study for obtaining highly sensitive fluorescent proteins toward transition metals**” demonstrates the obtaining of genetically modified proteins with improved photophysical properties whose metal binding affinty is in nanomolar range. Scientific work is built on two levels. First, it was realized a theoretical study about fluorescent proteins and of their possible applications, as well as theoretical analysis of its fluorescence. The experimental part includes the modification of genes encoding the enhanced green fluorescent protein isolated from *Aequora Victoria*, their production and characterization. In this manner mutant EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) were produced that contained a new metal binding site formed by two histidines in the chromophore vicinity (EGFP/2H). In some of the mutants peripheral metal binding sites were created which also contained histidines (EGFP/h2H), as well as cisteine (EGFP/h2Hc). Photophysical and photochemical analysis have led to the conclusion that the EGFP/h2Hc has extremly high affinity toward copper ions. Thus, the EGFP/h2Hc will be suitable for intracellular monitoring of copper due to its nanomolar sensitivity, and to the fact that its genes may be introduced into a given organism without losing its specific structure. Next, the causes of nanomolar-affinity binding were investigated with specific approach that combines theoretical and experimental techniques. Thus, in the first instance it was determined the magnitude of phenolate-ring distortion (40°) from EGFP/h2Hc protein’s chromophore during the copper saturation process.