

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos magistro studijų programos II k. studentas

Jonas Virkutis

Magistrinis darbas

M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų savybių tyrimai

Darbo vadovai:

Dr. Renata Rimšėlienė, Marija Žvirblienė

Vilnius, 2021 m.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

JONAS VIRKUTIS

M-MuLV atvirkštinės transkriptazės mutantų savybių tyrimai

Molekulinės biologijos magistro studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Atvirkštinių transkriptazių (AT) vykdoma komplementarios DNR sintezė – vienas iš dažniausių molekulinėje biologijoje taikomų metodų. Susintetinta komplementarioji DNR gali būti panaudojama klonavimo, genų raiškos bei sekoskaitos procedūruose. Vienas iš tokių naudojamų fermentų yra aukštu kataliniu aktyvumu pasižyminti *Moloney* pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė. Žymus *Moloney* pelių leukemijos viruso atvirkštinės transkriptazės pritaikomumas skatina sukurti geresnėmis savybėmis, pavyzdžiui, didesniu aktyvumu, procesyvumu ar mažesniu jautrumu slopikliams, pasižyminčius mutantus. Todėl identifikavus norimomis savybėmis pasižyminčius atvirkštinės transkriptazės mutantus, būtų galima patobulinti daugumą molekulinės biologijos eksperimentų.

Ankstesniuose tyrimuose buvo identifikuota 12 unikalių *Moloney* pelių leukemijos viruso atvirkštinės transkriptazės mutacijų, galinčių pagerinti fermentų termostabilumą, atsparumą inhibitoriams bei kitas savybes. Šio darbo tikslas yra charakterizuoti 12 sukurtų M-MuLV AT taškinių mutantų ir atrinkus geriausius, sukonstruoti daugybinius M-MuLV AT mutantus bei ištirti jų savybes. Darbo metu buvo nustatyta 12 taškinių mutacijų įtaka fermentų savybėms kaip termostabilumui, atsparumui inhibitoriams bei jautrumui vieno-žingsnio AT-kPGR. Identifikavus geriausią įtaką fermento savybėms turėjusias mutacijas, genų inžinerijos metodais buvo sukurti dvigubi ir trigubi taškiniai M-MuLV AT mutantai. Tyrimo metu buvo atlikta daugybinių mutantų gryninimo, grynumo ir aktyvumo koncentracijos nustatymo darbai bei pademonstruota, jog daugybinių mutacijų rinkiniai gali dar labiau pagerinti tikslines fermentų savybes.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

JONAS VIRKUTIS

Analysis of Properties of the M-MuLV Reverse Transcriptase Mutants

Master's thesis

SUMMARY

Complementary DNA synthesis is one of the most used molecular biology methods which is performed by reverse transcriptases. Synthesized complementary DNA can be applied in cloning, gene expression and sequencing procedures. One of such cDNA producing enzymes is *Moloney* leukemia virus reverse transcriptase which is distinguished by a high level of synthesis activity. Significant application of *Moloney* reverse transcriptase motivates to create better performing mutants that could have a higher synthesis activity, processivity and an increased resistance to inhibitors. Therefore identified reverse transcriptase mutants with desirable properties could improve variety of molecular biology experiments.

In previous experiments 12 unique mutations that could improve *Moloney* leukemia virus reverse transcriptase thermostability, resistance to inhibitors and other properties were identified. The aim of the study was to examine previously developed 12 M-MuLV RT mutants and select the best performing mutations for further multiple mutant construction. During this work, the effect of these 12 mutations on reverse transcriptase thermostability, resistance to inhibitors and sensitivity in one-step RT-qPCR was identified. Mutations that had the best positive impact on the features of reverse transcriptase were selected for further double and triple single-point mutant construction. During the research multiple mutants of reverse transcriptase were purified and it was shown that the collection of several mutations could have a more positive influence on enzyme features.