

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

MINDAUGAS VAITKEVIČIUS

Escherichia coli genomo mutagenezė *in vivo*

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“

Darbo vadovai
prof. dr. Arvydas Lubys
dakt. Žana Kapustina

Vilnius, 2020

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Mindaugas Vaitkevičius

Escherichia coli* genomo mutagenezė *in vivo

Genetikos magistrinių studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Norint patobulinti baltymų raiškos procesus pramoninėmis ar laboratorinėmis sąlygomis naudojant *Escherichia Coli* laboratorinius kamienus, vis dažniau kuriami redukuoto genomo kamienai. Laboratorinėmis sąlygomis šie kamienai gali augti greičiau ir pasiekti didesnę kultūros tankį. Kuriant kamienus su redukuotu genomu, būtina žinoti genomo lokusus, kuriuos galima pašalinti, nelėtinant ląstelių augimo ar nesukeliant letalaus fenotipo. Iki šiol atliktuose darbuose, būtinųjų genų nustatymas buvo atliekamas išveiklinant tik po vieną geną ląstelės genome, tačiau atliekant tokius tyrimus neįmanoma sužinoti, kokią įtaką ląstelės fenotipui gali lemti kelių genų tarpusavio sąveikos. Konstruojant redukuoto genomo kamienus remiantis tokiais tyrimais gali pasireikšti sintetinis letalumas.

Šio darbo tikslas - ištirti *E. coli* genomo toleranciją daugybinėms insercijoms. Darbo metu buvo sukurta iki šiol neaprašyta plazmidžių osciliacijos sistema, kuri pasitelkiant Tn5 transpoziciją leidžia atlikti daugybines transpozonų insercijas *E. coli* genome. Sugeneruota mutantų biblioteka (N = 96), kurioje 54 mutantai turėjo bent dvi insercijas genome. Šio tyrimo rezultatai parodo, jog naudojant oscilijuojančių plazmidžių sistemą galima generuoti insercinių mutantų bibliotekas su daugybinėmis insercijomis.

VILNIUS UNIVERSITY
Life Sciences Center

Mindaugas Vaitkevičius

***In vivo* mutagenesis of *Escherichia coli* genome**

Master Thesis

SUMMARY

To improve heterologous protein expression and growth of laboratory strains of *Escherichia Coli*, creation of minimal genome strains is becoming more widespread. These minimal genome strains often exhibit rapid growth and grow to higher cell densities. To create these minimal genome strains it is essential to know the loci which can be removed from *E. coli* genome without consequences to cell growth under laboratory conditions. Until now this essential gene research was focused on single genes only. However, using single gene mutants can lead to misclassifying genes as non-essential because of synthetic lethality.

The goal of this work was to analyze whether the genome of *E. coli* is tolerant to multiple transposon insertions. During the study, a novel system of oscillating plasmids was created. Using this system, which allows to insert multiple Tn5 transposon copies to the genome, an insertional mutant library was generated. 54 of the 96 mutants had at least two insertions in their genome. This proves, that using the aforementioned plasmid system it is possible to create insertional mutant libraries, that have multiple insertions in their genome.