

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gyvybės mokslų centras
Mikrobiologijos ir biotechnologijų katedra

Mikrobiologijos ir biotechnologijų magistro studijų programos II kurso studentas
Tomas Daukšas

Magistro baigiamasis darbas

**Mikroelementų (Fe, Mn ir Cu) įtaka *E. coli* K802/pT7a-GCSF
fermentacijos procesui ir tikslinio baltymo ekspresijai**

Darbo vadovas:
Nerijus Bernotas

Vilnius 2019

**Mikroelementų (Fe, Mn ir Cu) įtaka E. coli K802/pT7a-GCSF
fermentacijos procesui ir tikslinio baltymo ekspresijai**

Darbas atliktas:

UAB Sicor Biotech įmonėje.

TOMAS DAUKŠAS

Darbo vadovas:

NERIJUS BERNOTAS

TURINYS

Santrumpos	5
1. ĮVADAS.....	6
Darbo tikslas:	7
Darbo uždaviniai:.....	7
2. LITERATŪROS APŽVALGA	8
2.1. <i>Escherichia coli</i> bakterija.	8
2.2. E.coli K802 kamienas.	8
2.3. Plazmidė pT7a.	9
2.4. Žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (hG-CSF).....	10
2.5. Mielių ekstraktas.....	12
2.6. Geležies metabolizmas ir svarba ląstelių augimui.	12
2.7. Mangano metabolizmas ir svarba ląstelių augimui.....	15
2.8. Vario metabolizmas ir svarba ląstelių augimui.....	16
2.9. Triptofano biosintezė.	17
3. METODIKA.....	18
3.1. Ląstelių bankas.	18
3.2. Fermentacijos proceso schema.	18
3.3. Fermentacijoje naudota įranga.....	19
3.4. Fermentacijos terpė.....	19
3.5. Intarpinių kūnelių išskyrimas, tirpinimas ir baltymo pakartotinis sulankstymas.	19
3.6. Dietilaminoetilsafarozės (DEAE Sapharose) jonų mainų chromatografija.	19
3.7. Analitiniai metodai	20
Atvirkščios fazės, aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (RP-HPLC).....	20
Elektropurkštuvinės jonizacijos masių spektrometrija (ESI-MS).....	20
3.8. Statistiniai metodai.	20
Pilnas faktorinis planas.....	20
LINEST funkcija.....	21
Tiesinės regresijos modelis	21
4. REZULTATAI.....	22
4.1. Trūkstamų elementų identifikavimas.....	22
4.2. Reikiamos koncentracijos nustatymas.	29
4.3. Tikslinio baltymo priemaiša RRT 1.10.....	33

5. REZULTATŲ APTARIMAS	40
6. IŠVADOS.....	42
7. SANTRUMPA	43
8. SUMMARY	44
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	45
Knygos	45
Patentai.....	45
Straipsniai	45
Interneto svetainės	49

Santrumpos

RP-HPLC – angl. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* – atvirkščios fazės, aukšto efektyvumo skysčių chromatografija.

RRT – angl. *Ratio Retention Time* – santykinis sulaikymo laikas.

DNR – dezoksiribonukleino rūgštis.

GC – citozinas – guaninas.

tRNR – transportinė ribonukleino rūgštis.

rRNR – ribosominė ribonukleino rūgštis.

CGSC – angl. *Coli Genetic Stock Center* .

G-CSF – angl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor* – granuliocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius.

hG-CSF - angl. *human Granulocyte Colony Stimulating Factor* – žmogaus granuliocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius.

rhG-CSF – angl. *recombinant human Granulocyte Colony Stimulating Factor* – rekombinantinis žmonių granuliocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius.

In vivo – studija, stebėjimas atliekama gyvame organizme.

In vitro – studija, stebėjimas atliekamas dirbtinėje sistemoje.

GTP – Guanozin-5'-trifosfatas.

ATP – Adenozin-5'-trifosfatas.

NAD – nikotinamido adenino dinukleotidas.

NADH – redukuota nikotinamido adenino dinukleotido forma.

SOD – angl. *Super Oxide Dismutase* – superoksido dismutazė.

DLB – Darbinis Ląstelių Bankas.

ESI-MS – angl. *ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry* – elektropurkštuvinės jonizacijos masių spektrometrija.

1. ĮVADAS

UAB Sicor Biotech biotechnologijų įmonė gaminanti biologinius vaistinius preparatus ir rekombinantinius baltymus. Įmonė priklauso „Teva Pharmaceutical Industries“ įmonių grupei ir savo produktus eksportuoja į 52 pasaulio šalis, tokias kaip Jungtinės Amerikos Valstijos, Japonija, Rusija ar Europos sąjungos šalys.

Įmonėje rekombinantinių baltymų ekspresijai naudojamos prokariotinės ląstelės, dažniausiai tai *Escherichia coli*. Jų kultivavimui naudojami nerūdijančio pieno bioreaktoriai, kurių tūris siekia iki 1500 L. Šiuo metu įmonė savo portfelyje turi keletą gaminamų produktų.

Vieno iš gaminamų produktų fermentacijos etape, ląstelių auginimui naudojama kompleksinė mitybinė terpė. Į jos sudėtį įeina tokios neapibrėžtos sudėties medžiaga kaip mielių ekstraktas. Dėl savo gamybos specifikos ir naudojamų žaliavų, skirtingos šių medžiagų gamybos partijos gali ženkliai skirtis savo sudėtimi ir daryti reikšmingą įtaką proceso parametrams, kuriame šios medžiagos yra naudojamos (Zhang et al., 2003).

2016 metų gruodžio mėnesį, vienos iš fermentacijos serijų metu pastebėtas smarkus proceso parametrų kritimas. Pagamintos serijos biomasės išeiga buvo ženkliai, apie 20% mažesnė, nei paskutiniųjų metų vidurkis ir nesiekė specifikacijos ribų. Buvo peržiūrėti kritiniai proceso parametrai ir jokių neatitikimų nerasta. Galiausiai prieita išvados, kad fermentacijos proceso parametrų redukciją lėmė pasikeitusi mielių ekstrakto partija. Panašus, tik ne toks žymus proceso parametrų pokytis buvo stebėtas ir anksčiau, keičiantis mielių ekstrakto partijoms.

Siekiant išsiaiškinti tiksliai biomasės išeigos sumažėjimo priežastis įmonėje buvo inicijuotas tyrimas Projektų ir procesų vystymo skyriuje. Kol vyko tyrimas mielių ekstrakto gamintojas surado ir pateikė mielių ekstrakto partiją, kuri generavo nors ir mažesnę biomasės išeigą nei įprasta, tačiau ji atitiko specifikuojamas ribas, ir gamyba galėjo būti tęsiama tyrimo metu.

Kokybės skyriaus laboratorijoje testuojant galutinį produktą, gautą iš biomasės, kurios gamyboje buvo naudojamas minėtas mielių ekstraktas, RP-HPLC analizės metu nustatyta didesnis nei leistina tikslinio baltymo priemaišų kiekis. Šios priemaišos kiekis išliko ir tolimesnių serijų metu, kuriose fermentacijos metu buvo naudojama mielių ekstrakto partija, generuojanti žemesnius fermentacijos proceso parametrus nei įprasta.

Pasikeitus mielių ekstrakto partijai UAB Sicor Biotech įmonėje buvo susidurta su problema: sumažėjusi fermentacijos proceso biomasės išeiga ir tikslinio baltymo priemaišos atsiradimas, kurios taikomas gryninimo metodas negeba pašalinti iki reikiamo lygio. Šiai problemai spręsti pradėtas tyrimas, kuriame dalyvavo Projektų ir procesų vystymo skyriaus

mokslininkų ir Gamybos skyriaus darbuotojų komanda. Tyrime taikyti metodai ir gauti rezultatai pateikti šiame darbe.

Darbo tikslas:

Išsiaiškinti biomasės išeigos sumažėjimo ir tikslinio baltymo priemaišos RRT 1,10 atsiradimo priežastis ir atkurti fermentacijos proceso parametrus į tipinį lygį.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti augimo terpės komponentus, kurie lėmė fermentacijos parametrų redukciją ir tikslinio baltymo priemaišos RRT 1,10 kiekio pasidėjimą.
2. Nustatyti reikiamą trūkstamų komponentų koncentraciją, reikalingą pasiekti fermentacijos proceso parametrų specifikacijos ribas.
3. Ištirti reikiamų komponentų trūkumo ir jų pridėjimo į augimo terpę įtaką tikslinio baltymo kokybei ir priemaišų lygiui.
4. Charakterizuoti tikslinio baltymo priemaišą RRT 1,10.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. *Escherichia coli* bakterija

Escherichia coli – Gammaproteobacteria klasei priklausantys mikroorganizmai. Tai gram-neigiamos, lazdelės formos bakterijos, fakultatyviniai aerobai. Dažniausiai šios bakterijos randamos gyvūnų virškinamajame trakte, kur sudaro nemažą dalį visos mikrobiotos. Be to egzistuoja ir patogeniniai kamienai, kurie sukelia virškinamojo trakto, kvėpavimo takų ar nervų sistemos infekcijas. Dėl savo plačios biologijos ir plataus pritaikymo spektro, ši rūšis, ko gero, geriausiai ištyrinėta ir plačiausiai taikoma bakterijų rūšis pasaulyje (Madigan et al., 2014).

E. coli „aukso amžius“ prasidėjo po Tatum ir Lederberg tyrimų susijusių su aminorūgščių biosinteze ir genetinės medžiagos keitimusi tarpusavyje. Šie tyrimai pelnė autoriams Nobelio premiją fiziologijos ir medicinos srityje (Tatum ir Lederberg, 1947). Jau po keletos dešimtmečių, mokslininkai sukūrė pirmąjį *E. coli* transformantą, į kurį buvo įterpta *in vitro* sukonstruota plazmidė (Cohen et al., 1973) – šiuolaikinės biotechnologijos pagrindas (Wong et al., 2018). 1997 metais buvo pilnai sekvenuotas *E. coli* K-12 kamieno genomas, kurį sudaro 4,6 milijonai bazių porų. K-12 buvo pasirinktas dėl to, kad šis kamienas yra menkai paveiktas genetinių manipuliacijų. Sekvenavimas buvo atliktas Viskonsino-Madisono universiteto mokslininkų su F. R. Blattner priešakyje. Iki tol buvo sekvenuoti tik 6 organizmų genomai: *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *M. pneumoniae*, *Methanococcus jannaschii*, *Synechocystis sp.* ir *Saccharomyces cerevisiae* (Blattner et al., 1997).

E. coli bakterijos pasižymi greitu augimu ir gebėjimu augti tiek visiškai sintetinėje, tiek nesintetinėje terpėje, kas leidžia šią rūšį plačiai taikyti molekulinėje biologijoje ir biotechnologijose (Idalia ir Bernardo, 2017).

2.2. *E.coli* K802 kamienas

Pirmasis *E.coli* K802 kamieną išskyrė ir aprašė Ženevos universiteto mokslininkas William B. Wood 1966 metais. Tai labai senas kamienas, gautas keliais etapais. Kamieną K12 veikiant Rentgeno ir UV spinduliais, taip pat kultūras infekuojant įvairiais bakteriofagais buvo gautas C600 kamienas (Kleiner-Grote, 2017). Pastarasis kamienas buvo naudojamas eksperimentuose, kuriuose buvo tiriamas *E.coli* gebėjimas apsisaugoti nuo bakteriofago λ , suardant (restrikcija) ar modifikuojant viruso DNR. Šių eksperimentu metu buvo gauta spontaniinė mutacija, dėl kurios kamienas nebegebėjo vykdyti svetimos DNR restrikcijos. Kamienas buvo izoliuotas ir jam suteiktas pavadinimas K802 (Wood, 1966).

Šis kamienas dar kitaip vadinamas WA802. Kamieno genotipas pateiktas **1.1 lantelėje**. Kadangi šis kamienas negeba vykdyti svetimos DNR restrikcijos (r_K^-), jis plačiai

taikomas klonavimo eksperimentams ir rekombinantinių baltymų gamyboje (Kleiner-Grote et al., 2017). Kamienas tinkamas tiek antikūnų fragmentų (Wich ir Dassler, 2007), tiek konjuguotų baltymų gamyboje (Yang ir kt., 1998).

1.1 lentelė. *E. coli* K802 genotipas

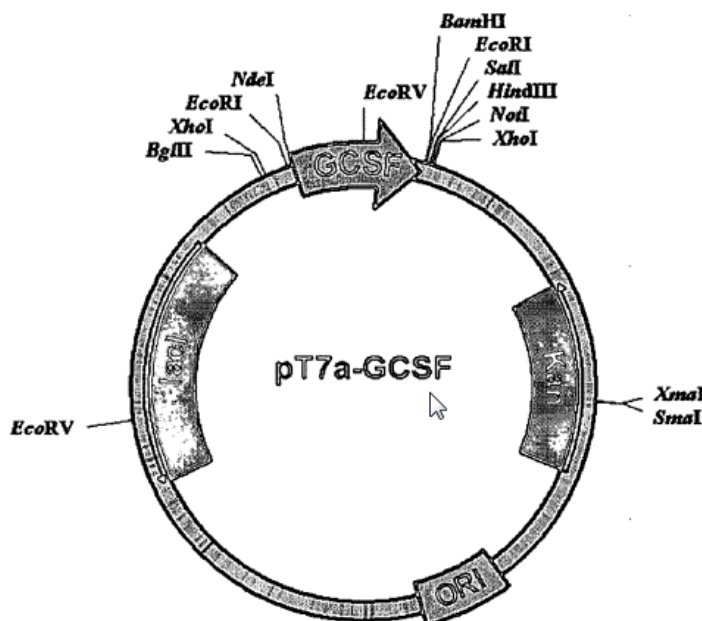
Genas	Aprašymas
<i>F</i>	Neturi F plazmidės.
<i>e14 (McrA)</i>	Inaktyvuotas McrA restriktazės genas. Negeba restriktuoti svetimų DNR.
<i>lacY1</i>	Delecija laktozės permeazės gene. Ribotas laktozės transportas.
<i>lacA</i>	Mutacija tiogalaktozido acetiltransferazės gene. Negeba fermentuoti laktozės.
<i>glnV44</i>	UAG stop kodono supresija. Vietoje stop kodono įterpiamas glutaminas.
<i>galT22</i>	Mutacija galaktozės-1-fosfato uridililtransferazės gene. Negeba fermentuoti galaktozės.
<i>rfbD1</i>	Mutacija dTDP-L-ramnozės sintetazės gene. Nesintetina O antigeno (lipopolisacharidas).
<i>metB1</i>	Mutacija cistationino gama sintetazės gene. Nesintetina metionino.
<i>mcrB1</i>	Mutacija McrB gene, inaktyvuotas fermentas. Negeba restriktuoti svetimų DNR.
<i>hsdR2</i>	Mutacija endonukleazės R gene. Negeba restriktuoti svetimų DNR.

2017 metais buvo pilnai sekvenuotas šio kamieno genomas, naudojant „Illumina MiSeq“ sistemą. Genomo dydis – 4,5 milijonai bazių porų, GC kiekis – 50,76%. Visą genomą sudaro 4176 genai koduojantys baltymus, 71 genai - tRNR ir 2 genai rRNR. Ankstesni šaltiniai teigė, kad šis kamienas taip pat turi mutaciją *rfbC1* gene (CGSC duomenų bazė), tačiau nusekvenavus genomą paaiškėjo, kad delecija yra *rfbD1* gene ir dėl jos yra pasislinkęs skaitymo rėmelis. *lacY* gene deletuotas išsitas regionas sudarytas iš 38726 bazių porų (Kleiner-Grote et al., 2017).

2.3. Plazmidė pT7a

Tai žiedinė plazmidė, į kurią gali būti įterpiamas tikslinio baltymo genas (Bumelis et al., 2007). Be to ši plazmidė koduoja atsparumo kanamicinui geną, *ori* seką, reikalingą plazmidės replikacijai, *lacI* geną, skirtą lac operono represijai ir bakteriofago T7 promotorių, su dviguba *lacO* seka ir vieta ribosomų prisitvirtinimui. Promotorius aktyvuojamas izopropiltio-β-D-galaktorizu (IPTG). Plazmidės schema pavaizduota **1.1 pav.** Pati plazmidė pasižymi savo stabilumu ir puikiai tinka vidutinio dydžio rekombinantinių baltymų gamybai.

Kaip ekspresijos vektorius šioje plazmidėje naudojamas NdeI endonukleazės veikimo vieta, kurioje yra „start“ kodonas ATG (Ališauskaitė et al., 2012).



1.1 pav. Plazmidės pT7a-GCSF sandaros schema (Bumelis et al., 2007)

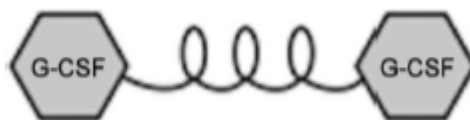
2.4. Žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (hG-CSF)

Žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius – tai glikozilintas baltymas, hormonas, žmogaus organizme skatinantis hemopoetinių kamieninių ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, aktyvaciją į neutrofilų-granulocitų ląstelių linijas ir pilną neutrofilų subrendimą. Taip pat žmogaus organizme šis faktorius išskiriamas audinių pažeidimų ar infekcijos vietoje, taip į šią vietą pritraukdamas neutrofilus. Rekombinantinis žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius (rhG-CSF) naudojamas norint atstatyti pakankamą neutrofilų lygį kraujyje po chemoterapijos seanso (Hollingshead ir Goa, 1991).

Pirmą kartą žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius iš kitų kolonijas stimuliuojančių faktorių buvo išskirtas 1979 metais iš žmogaus placentos pasitelkus fenil-safarozės chromatografiją (Nicola et al., 1979). Pamačius didžiulį potencialą pacientų gydymui, 1986 metais buvo sukonstruotas rekombinantinio žmogaus granulocitų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus ekspresijos mechanizmas pasinaudojant žmogaus karcinomos ląsteles (Nagata et al., 1986). *In vivo* hG-CSF yra glikozilintas baltymas, tačiau įterpus šio baltymo ekspresijos mechanizmą į *E.coli* ląsteles gauta neglikozilinta forma. Nors *in vitro* glikozilinta forma pasižymi 25% didesniu aktyvumu nei neglikozilinta forma, tačiau tiriant pacientų gydymo efektyvumą abejomis baltymo formomis didesnio skirtumo tarp jų nepastebėta (Bönig et al., 2001). Taip pat ekspresijos *E.coli* metu gaunama baltymas N gale turi papildomą metionino molekulę (Souza et al., 1986).

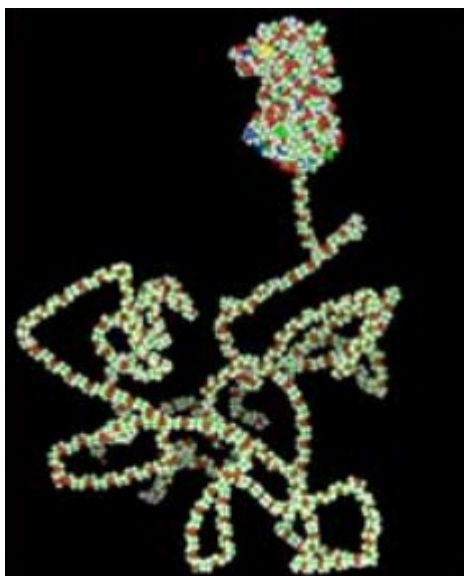
Pirmas vaistinis preparatas pagamintas iš rhG-CSF ekspresuoto E.coli ląstelėse pasirodė 1991 metais. Jį pagamino amerikiečių kompanija AMGen, preparato pavadinimas - Neupogen®. Vaistiniai preparatai su šia veikliąja medžiaga dar ir šiandien išlieka paklausūs, be to atrandama vis daugiau teigiamų hG-CSF savybių, pavyzdžiui skeleto raumenų atstatymas po traumų ar pažeidimų, dėl ko ši veiklioji medžiaga ir toliau išliks paklausiai (Wright et al., 2017).

Dėl didelės konkurencijos šis baltymas nuolat tobulinamas siekiant suteikti jam jo veikimą pagerinančių savybių. Viena jų tai prailgintas veikimas, kuomet molekulė yra dirbtinai padidinama siekiant, kad ji kuo lėčiau būtų pašalinama iš organizmo. Tam pasiekti naudojami tokie metodai kaip dviejų molekulių sujungimas per peptidinę grandinę. Dvi G-CSF molekulės sujungtos α jungtimi (žiūrėti **1.2 pav.**) pasižymi didesniu aktyvumu *in vivo* nei monomerinė forma, taip pat organizme išlieka kur kas ilgiau (Mickienė et al., 2017).



1.2 pav. G-CSF dimeras sujungtas α jungtimi (Mickienė et al., 2017)

Kitas rhG-CSF modifikavimo būdas pagerinantis jo veikimo savybes – glikopegiliavimas. Prie rhG-CSF molekulės N galo prijungiama polietilenglikolio grandinė, kuri padidina molekulės dydį (žiūrėti **1.3 pav.**) ir molekulinę masę, dėl ko vaisto pašalinimas iš organizmo per inkstus smarkiai pailgėja. Taip modifikuotos rhG-CSF molekulės gyvavimo pusperiodis – 42 val., tuo tarpu nemodifikuotos molekulės – 3,5 val. Be to ši modifikacija nedarė ženklios įtakos baltymo aktyvumui (Molineux, 2004).



1.3 pav. Glikopegiliuotas G-CSF baltymas (Molineux, 2004)

2.5. Mielių ekstraktas

Mielių ekstraktas – tai vienas iš pagrindinių kompleksinės augimo terpės sudedamųjų dalių. Jo gamyboje dažniausiai naudojamas *Saccharomyces cerevisiae* rūšies mielės, kurios specialiai tam auginamas melasos turtingoje terpėje, arba tiesiog surenkamos iš alaus daryklų kaip šalutinis produktas. Ekstraktas gaunamas gyvas ląsteles paveikus slėgiu ir aukšta temperatūra, prasideda ląstelių autolizė ir išsiskyre pačių ląstelių fermentai suskaido maistines medžiagas į mažesnės molekulinės masės junginius (Zimbro ir Power, 2003).

Mielių ekstraktas kultūrinėje terpėje naudojamas kaip įvairių aminorūgščių, peptidų, vandenyje tirpių vitaminų, augimo faktorių šaltinis (Crueger ir Crueger, 1989). Taip pat šioje žaliavoje gausu mikroelementų, tokių kaip magnis, geležis, varis, cinkas, chromas ir pan. Šie elementai itin reikalingi ląstelių augimui ir baltymų sintezei (Grant ir Pramer, 1962).

2.6. Geležies metabolizmas ir svarba ląstelių augimui

Pats svarbiausias iš visų mikroelementų – geležis. Šis mikroelementas dalyvauja svarbiausiose ląstelės metabolizmo reakcijose, tokiuose kaip ląstelinis kvėpavimas. Šio metalo trūkumas gali daryti ženklį įtaką ląstelių augimo greičiui ir produkto kokybei (Madigan et al., 2014). Taip pat dėl savo cheminių savybių, šis elementas labai lengvai prarandamas netinkamai ruošiant kultūrinę terpę, sudaro netirpius junginius (Andrews et al., 2003).

Gyvoje ląstelėje geležis randama dviejų formų: Fe^{2+} ir Fe^{3+} . Šios abi grupės pasižymi skirtingomis savybėmis, todėl tai leidžia geležį panaudoti dar plačiau įvairiose metabolizmo reakcijose (Beinert et al., 1997): fotosintezėje, azoto fiksacijoje, metanogenezėje, vandenilio metabolizme, kvėpavime, trikarboninių rūgščių cikle, deguonies pernašoje, genų raiškos reguliavime ar DNR biosintezėje (Andrews et al., 2003). Nors šis elementas yra labai svarbus bakterijoms, tačiau esant terpei prisotintai deguonies, didelė laisvos geležies koncentracija yra toksiška ląstelėms, nes skatina reaktyvių deguonies formų susidarymą. Dėl šios priežasties, evoliucijos metu, ląstelėje išsivystė gebėjimas surišti geležį specialiuose baltymuose (Touati, 2000).

Fe^{2+} *E.coli* bakterijos iš aplinkos į ląstelę perneša pasinaudodamos Feo transporto sistemą. Pačią transporto sistemą sudaro trys baltymai: FeoA, FeoB ir FeoC, koduojami viename lokuse. Nors šio geno raiška aktyvuojama esant anaerobinėms sąlygoms, tačiau eksperimentų metu nustatyta, jog jis veikia esant ir aplinkoje deguonies. FeoA tiksli funkcija nėra žinoma. FeoB tai baltymas permeazė, kuris perveria vidinę plazminę membraną ir sudaro porą, per kurią pernešama divalentė geležis panaudojant GTP. Per išorinę membraną Fe^{2+} patenka per baltymus porinus. FeoC tiksli funkcija taip pat nėra žinoma, tačiau manoma, kad

jis dalyvauja geležies surišime ir pernešime į reikiamą vietą jau pačiame citozolyje (Cartron et al., 2006).

Aplinkoje esant deguonies, pagrindinis geležies šaltinis tampa Fe^{3+} . Kadangi ši geležies forma yra labai mažai tirpi, jos pernešimas iš aplinkos į bakterijų ląstelės vidų šiek tiek sudėtingesnis. Tam, kad Fe^{3+} būtų pranešta per išorinę ir vidinę membranas, visų pirma ji turi būti prijungta prie specifinių baltymų nešėjų, kurių kompleksas su ja tampa tirpus. Tai labai specifiniai baltymai gebantys prisijungti Fe^{3+} , esant itin mažai koncentracijai. *E. coli* atveju tai enterobaktinas. Toks baltymo-trivalentės geležies kompleksas yra virš 700 Da dydžio, todėl jam pernešti reikalingas specialus baltymas nešėjas – FhuA. Tai baltymas sudaryta iš dviejų funkcinių dalių – kanalo perveriančio išorinę membraną ir dalies esančios vidinėje plazminėje membranoje, kuri generuoja protovaros jėga reikalingą pernašai (Winkelmann, 2001).

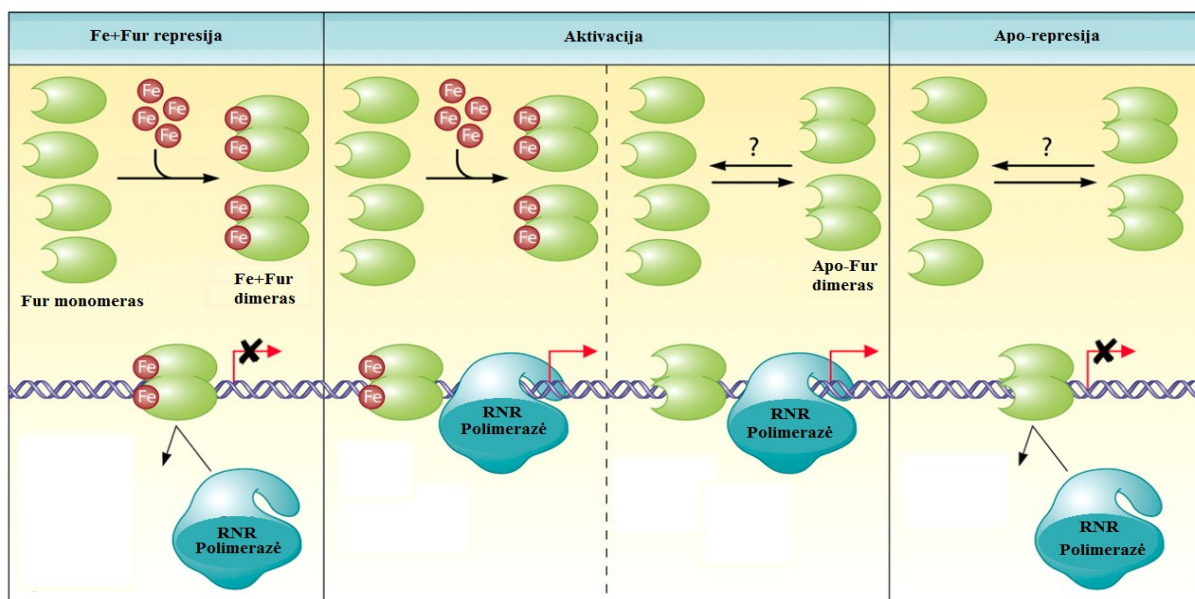
Baltymo-trivalentės geležies kompleksui atsidūrus periplazminėje ertmėje, prie jo prisijungia specifinis baltymas FhuD, kuris nunešą kompleksą prie FhuB baltymo kanalo, kuris perveria vidinę membraną. Prie FhuB baltymo kanalo prisijungę FhuC baltymai pasižymi ATPaziniu veikimu, todėl šiai pernašai sunaudojama ATP energija. Gram-neigiamose bakterijose visų trivalentės geležies pernešime dalyvaujančių baltymų gerų raiška reguliuojama per Fur represorių šeimą (Winkelmann, 2001).

E. coli bakterijų citoplazmoje geležies jonai nuo enterobaktino atskiriami specialių fermentų esterazių, kurios hidrolizuoja esterinę jungtį baltyme nešiklyje, keičiasi jo koonformacija ir jo afiniškumas trivalentės geležies jonams sumažėja. Šios esterazės koduojamos tame pačiame genų klasteryje kaip ir pats enterobaktinas (Earhart, 1996).

Bakterijų citozolyje geležis saugoma ne tik joninėje formoje, tačiau ir sujungta specialių baltymų saugyklų. Jos geležį atlaisvina esant jos trūkumui. Taip pat toks geležies sujungimas apsaugo nuo laisvųjų radikalų susidarymo vykstant geležies ir vandenilio peroksido reakcijai. Yra žinomos trys rūšys tokių baltymų saugyklų: feritinais, bakterioferitinais ir Dsp baltymais. Visi trys baltymai sutinkami *E. coli* bakterijose. Šie baltymai sudaryti iš identiškų domenų, 24 feritinas ir bakterioferitinas, 12 Dsp baltymas. Tokia šių baltymų sandara leidžia vienai baltymo molekulei suriši iki 3000 geležies jonų (Cornelis et al., 2011). Didelis laisvos divalentės geležies kiekis citozolyje yra itin pavojingas ląstelei. Fentono reakcijos metu divalentė geležis yra oksiduojama vandenilio peroksido ir susidaro trivalentė geležis ir laisvasis hidroksilo radikalas, kuris itin pavojingas ląstelei (Koppenol, 2001).

E. coli ląstelėse, net 77 genai yra tiesiogiai reguliuojami Fur. Fur represorius reguliuoja ne tik gerų susijusių su geležies metabolizmu raišką, bet ir nemažai kitų, itin svarbią funkciją atliekančių genų. Pats represorius pasižymi įvairiomis veikimo savybėmis, dalis genų

repreuojami esant aplinkoje pakankamai geležies, kita dalis esant geležies trūkumui (žiūrėti 1.4 pav.). Esant geležies stygiui terpėje yra deaktyvuojama geno *mntH* represija. Šio geno produktas – divalenčių metalo jonų transporteris. Šis baltymas transporteris pasižymi didžiausiu afiniškumu mangano(II) jonams, kurie ląstelėje naudojami DNR sintezei, esant geležies stygiui (Seo et al., 2014). Geležis būtinas elementas ne tik įvairiems DNR pažaidų taisymo fermentams, tačiau reikalingas ir pačioje DNR sintezėje, kai kurios DNR polimerazės savo sudėtyje turi geležies-sieros klasterius (Puig, 2017).



1.4 pav. Fur represijos/aktivacijos mechanizmas (Carpenter et al., 2009)

represoviaus – akonitato hidratazė. Taip pat akonitato hidratazė savo sudėtyje turi geležies-sieros klasterį. Šis fermentas dalyvauja trikarboninių rūgščių cikle (Krebso ciklas) ir katalizuota citrato izomerizaciją į izocitrata (McHugh et al., 2003). Esant geležies stygiui terpėje, sutrinka šio geno raiška ir kuriam laikui gali sutrikti trikarboninių rūgščių ciklo veikimas (Seo et al., 2014).

Geležis dalyvauja pačiose svarbiausiose ląstelės metabolizmo reakcijose. Viena jų tai elektronų pernašos grandinė. Geležies jonai įeina į elektronų pernašos grandinės komponentų sudėtį ir ten atlieka esmines funkcijas. Į pirmojo elektronų pernašos grandinės komplekso (NADH dehidrogenazės) sudėtį įeina net 9 geležies-sieros klasteriai, kurie dalyvauja redokso reakcijose ir protonų pernašoje. Šiame komplekse taip pat yra ir dešimtas geležies-sieros klasteris N2, tačiau tiksli jo funkcija nėra žinoma (Flemming et al., 2003).

Geležis įeina ir į visų elektronų pernašos grandinėje esančių citochromų sudėtį. Trečiasis elektronų pernašos grandinės kompleksas susideda iš keletos baltymų, į kurių sudėtį įeina du skirtingi citochromai b (b_L ir b_H), vienas citochromas c_1 ir vienas geležies-sieros klasteris. Pagrindinė šio komplekso funkcija perduoti elektronus iš chinonų citochromui c,

esančiam periplazminėje erdmėje. Taip pat šis kompleksas gali redukuoti/oksiduoti chinonus (Liu et al., 2014). Ketvirtasis elektronų pernašos grandinės kompleksas savo sudėtyje turi citochromą a ir a₃. Šis baltymų kompleksas dalyvauja protonų pernašoje ir perduoda elektronus galutiniam elektronų acceptoriui – deguoniui (Bernd, 1987).

Dar viena fermentų rūšis, kurių veikimui būtinas pakankamas kiekis geležies – geležies superoksido dismutazė. Šio fermento geno *sodB* raiškos reguliavimas vyksta taip pat per Fur represijos/aktyvacijos sistemą (Dubrac, 2000). Redukuota baltymo forma Fe(III)SOD efektyviai niautralizuoja hidroksilo ar azido radikalą ir susidaro oksiduota fermento forma Fe(II)SOD. Kritinę funkciją šiame fermente atlieka jo aktyvumo centre esantis geležies jonas (Lah et al., 1995).

2.7. Mangano metabolizmas ir svarba ląstelių augimui

Manganas kur kas rečiau sutinkamas elementas aplinkoje nei geležis. Nepaisant to, tai būtinas mikroelementas, dalyvaujantis įvairiose metaboliniuose procesuose bakterijose ir aukštesniuose organizmuose. Bakterijose manganas turi tris pagrindines funkcijas: dalyvauja redokso reakcijose, deguonies produkcijoje ir užtikrina atsparumą oksidaciniam stresui (Winkelmann, 2001).

Nepaisant savo svarbos, dideli mangano kiekiai ląstelei yra itin žalingi, todėl bakterijos privalo turėti griežtai reguliuojama mangano transporto sistemą. Bakterijose žinomi du pagrindiniai mangano jonų importo į ląstelę mechanizmai, MntH ir SitABCD (Zeinert et al., 2018).

Kadangi manganas aplinkoje dažniausiai egzistuoja divalentėje Mn²⁺ formoje, kuri yra tirpi, pro išorinę membraną šis elementas patenka per baltymus porinus. Iš periplazmos į citozolį mangano jonai yra pernešami baltymų nešiklių, vienas jų MntH. Šis nešiklis pernešimui naudoja protovaras jėgą. Taip pat šis baltymas gali pernešti ir geležies jonus, tačiau su kur kas mažesniu afiniškumu. Šio transporterio geno raiška taip pat glaudžiai susijusi su Fe-Fur represijos mechanizmu (Patzner ir Hantke, 2001). Eksperimentiškai įrodyta, kad *E.coli* mutantai, kuriuose yra inaktyvuotas *MntH* genas yra neatsparūs vandenilio peroksido stresui (Anjem et al., 2009). Dar vienas mangano jonų transporteris – SitABCD. Mangano pernešimui šis transporteris naudoja ATP energiją ir yra ypač efektyvus esant šiek tiek šarminėms aplinkos sąlygoms (Kehres et al., 2002).

Bakterijos mangano homeostazę savo ląstelėse palaiko ne tik importerių pagalba, bet ir šalina šio elemento perteklių per specialius baltymus eksporterius. Bakterijose sutinkamos dvi grupės mangano eksporterių: MntE ir MntP (Zeinert et al., 2018). MntE dažniausiai sutinkamas patogeninėse gram-teigiamose bakterijose, kur atlieka itin svarbią funkciją, šalina iš ląstelės mangano perteklių atsiradusį dėl aukos imuninio atsako (Grunenwald et al., 2019).

Tuo tarpu MntP eksporteris yra itin svarbus *E.coli* augimui. Esant šio geno mutacijai ląstelės nebegeba augti mitybinėje terpėje, kurios sudėtyje yra 0,5 mM MnCl₂ (Zeiner et al., 2018).

Viena svarbiausių mangano funkcijų ląstelėje – apsauga nuo reaktyvių deguonies formų. Egzistuoja mažiausiai trys skirtingi mechanizmai kaip manganas neutralizuoja ROS: mangano superoksido dismutazė (Mn-SOD) (Carlioz ir Touati, 1986), formuodamas mažo molekulinio svorio junginius, kurie neutralizuoja ROS nefermentiniu būdu (Barnese et al., 2012) ir pakeisdamas geležį fermentų aktyviajame centre taip apsaugodamas fermentą nuo pažeidimo (Sabota ir Imlay, 2011).

Mangano superoksido dismutazė pasižymi tokiais pats funkcinėmis savybėmis kaip ir geležies superoksido dismutazė. Kai kurie autoriai šiuos du fermentus netgi vadina izofermentais, tačiau skiriasi šių dviejų fermentų genų raiška. Fe-SOD geno *sodB* raiška vyksta tiek esant aerobinėms aplinkos sąlygoms, tiek aneorobinėms ir yra reguliuojamas Fe-Fur represijos mechanizmo. Tuo tarpu Mn-SOD geno *sodA* raiška vyksta tik esant aerobinėms sąlygoms ir yra reguliuojamas tiesiogiai – fermento substrato kiekiu. Inaktyvavus vieną iš šių genų *E.coli* žymesnių pokyčių nepastebėta, tuo tarpu inaktyvavus abu *sodA* ir *sodB* genus, ląstelės visiškai praranda gebėjimą augti aerobinėmis sąlygomis terpėje esant gliukozės. Augimas yra atstatomas į augimo terpę pridėjus visų 20 aminorūgščių mišinio (Carlioz ir Touati, 1986).

Manganas savo apsauginę funkciją prieš reaktyvias formas atlieka ir nesant fermentų sudėtyje. Žinoma, kad esant nedidelėms koncentracijoms, mangano fosfatas ir mangano karbonatas suriša laisvuosius radikalus ir taip apsaugo ląsteles nuo žalingo jų poveikio (Barnese et al., 2012).

Nustatyta, kad baltymų, kurių sudėtyje kaip kofaktorius veikia geležis, jautrumas oksidaciniam stresui yra labai didelis, ir dažnu atveju jie tampa pagrindiniu reaktyvių deguonies formų taikiniu, geležis oksiduojama ir fermentas tampa inaktyviu (Anjem ir Imlay, 2012). Pastebėta, kad esant pakankamam kiekiui mangano, jis gali pakeistį geležį, kai kuriose fermentuose ir atlikti kofaktoriaus funkciją. Tokie modifikuoti fermentai yra kur kas atsparesni oksidaciniam stresui, nes manganas dėl savo cheminių savybių yra daug sunkiau oksiduojamas nei geležis. Toks mangano gebėjimas atlikti geležies funkcijas stebimas ir tokiuose itin svarbiuose fermentuose ląstelės metabolizme kaip ribuliozės-5-fosfato 3-epimerazė dalyvaujanti pentozų fosfatinio kelio reakcijose (Sabota ir Imlay, 2011).

2.8. Vario metabolizmas ir svarba ląstelių augimui

Varis dar vienas gyvybiškai svarbus mikroelementas reikalingas bakterijų augimui. Tačiau dėl savo didelio reakingumo, didesni jo kiekiai yra itin pavojingi ląstelėms, todėl jos turi turėti mechanizmus pašalinančius net mažiausią vario perteklių iš citoplazmos

(Winkelmann, 2001). Ypač pavojingas varis tampa esant anaerobinėms sąlygomis, kuomet divalentė jo forma Cu^{2+} redukuojama iki vienvalentės Cu^+ (Rensing ir Grass, 2003).

Pagrindinė sistema reguliuojanti vario kiekį *E.coli* bakterijose CopA. Tai P tipo ATPazė. Šio transporterio geno raiška reguliuojama per CueR, kurio aktyvumas priklauso nuo vario ir sidabro kiekio esančio citozolyje. CopA taip pat pasižymi afiniškumu sidabru, cinkui, kadmiui ir švinui (Rensing et al., 1999). Taip pat yra duomenų, kad šis transporteris gali pernešti tik vienvalentį varį Cu^+ (Mandal et al., 2002).

Varis įeina į fermentų sudėtį ir ten veikia kaip kofermentas pavieniui arba įeina į sudėtingesnių junginių sudėtį. Vienas tokių, amino oksidazės kofermentas – 3,4,6-trihidroksifenilalamino chinonas (Cooper et al., 1992). Taip pat *E.coli* bakterijose randama ir vario-cinko superoksido dismutazė (CuZn-SOD), tačiau priešingai nei eukariotinėse ląstelėse, ženklesnės įtakos ląstelių augimui šis fermentas neturi. Didžiausią darbą ROS inaktyvavime bakterijose atlieka jau anksčiau minėtos Fe-SOD ir Mn-SOD (Benov ir Fridovich, 1994). Turbūt svarbiausias, ląstelės metaboliniu požiūriu, fermentas, į kurio sudėtį įeina varis – citochromo c oksidazė. Į jos antrojo subvieneto sudėtį įeina net trys vario jonai. Čia jie atlieka elektronų laidininkų funkciją (Steffens et al., 1987).

2.9. Triptofano biosintezė

Triptofanas – viena iš trijų aromatinių aminorūgščių, itin svarbi baltymų sintezėje. Dėl savo cheminės sandaros, triptofanas yra suardomas gaminant mielių ekstraktą ar kazeino hidrolizatą, ir į mitybinę terpę patenka oligopeptidų sudėtyje, todėl ląstelių augimo metu būtina užtikrinti triptofano biosintezę pačiose ląstelėse (Zimbro ir Power, 2003). Triptofano operono genų raiška reguliuojama *trpR* represoriaus, kurio aktyvumas priklauso nuo L-triptofano kiekio citozolyje (Gunsalus ir Yanofsky, 1980).

Triptofano biosintezėi kaip pradinė žaliava ląstelėse naudojamas *tryptophan*. Pirmojoje reakcijoje nuo *tryptophan* yra atskeliamas fosfoenolpiruvatas ir vyksta amininimo reakcija (reakcijai reikalingas L-gliutaminas ir L-gliutamatas). Susidaro aromatinis junginys – antranilatas. Reakcija katalizuojama fermento antranilato sintazės. Toliau vyksta kondensacijos reakcija, kuomet prie antranilato prijungiama aktyvuotas ribozės-5-fosfatas, reakcija katalizuoja antranilato-fosforibozil transferazė. Ribozės liekana modifikuojama ir susidaro indolas. Paskutinėje triptofano biosintezės reakcijoje prie indolo yra prijungiamas serinas (Michal ir Schomburg, 2012).

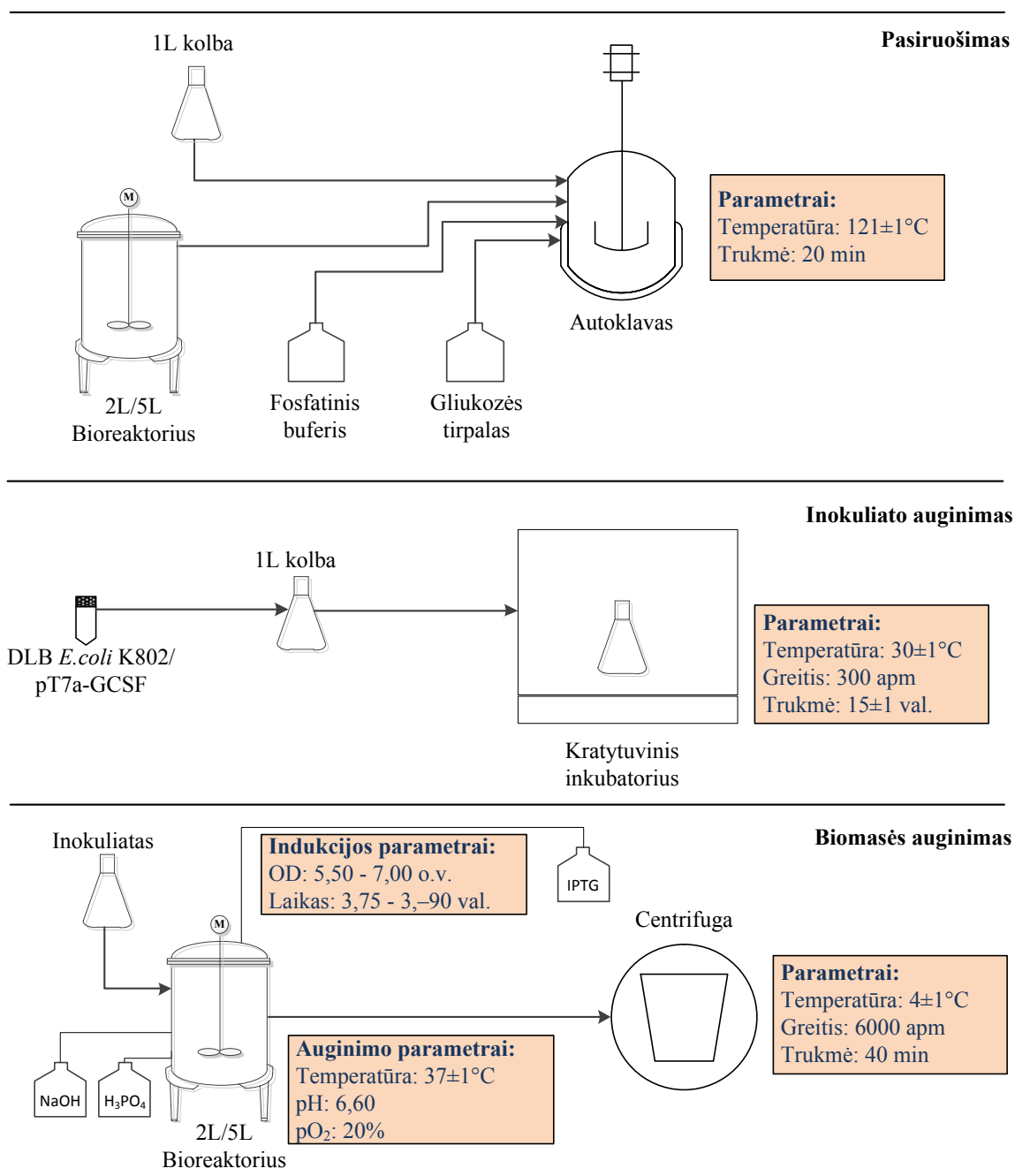
tryptophan ląstelėse yra sintetinama iš fosfoenolpiruvato eilės reakcijų metu. Šiose reakcijose dalyvaujančių fermentų aktyvumui ypač svarbus NAD/NADH balansas. Susidaręs *tryptophan* naudojamas ne tik triptofano, bet ir kitų dviejų aromatinių aminorūgščių biosintezėje – fenilalanino ir tirozino (Michal ir Schomburg, 2012).

3. METODIKA

3.1. Ląstelių bankas

Visų eksperimentų metu ir serijose, su kuriomis buvo lyginami gauti rezultatai, buvo naudojamas tos pačios gamybos serijos darbinis ląstelių bankas *E. coli* K802/pT7a-GCSF. Pagaminimo data – 2012 04 27. Laikymo sąlygos - $<-80^{\circ}\text{C}$. Kiekvienai eksperimentinei fermentacijai ar jų grupei buvo naudojamas vis naujas darbinis ląstelių bankas, kuris nebuvo pakartotinai atšildytas ir vėl užšaldytas.

3.2. Fermentacijos proceso schema



3.1 pav. *E. coli* K802/pT7a-GCSF fermentacijos proceso schema

3.3. Fermentacijoje naudota įranga

- Bioreaktoriaus valdymo blokas *Sartorius Biostat B Twin*;
- Bioreaktorius *Sartorius UniVessel®Glass 2 ir 5 L*;
- Kratytuvinis inkubatorius *B.Braun Biotech Certomat IS*;
- Autoklavas *Tuttnauer 5075 ELVC*;
- Centrifuga *Beckman Avanti J-25*.

3.4. Fermentacijos terpė

Kultūrinė terpė, kurioje buvo vykdoma fermentacija susideda iš šių komponentų:

- Rūgštinis kazeino hidrolizatas;
- Mielių ekstraktas;
- Amonio chloridas;
- Magnio sulfato heptahidratas;
- Di-natrio vandenilio fosfato dodekahidratas;
- Kalio di-vandenilio fosfatas;
- Gliukozė;
- Antiputokšlis.

3.5. Intarpinių kūnelių išskyrimas, tirpinimas ir baltymo pakartotinis sulankstymas

Laštelės buvo ardamos aukšto slėgio homogenizatoriumi, ardymo procedūrą kartojant du kartus. Suardyta laštelių suspensija centrifuguojama fiksuoto kampo centrifuga. Nuosėdos plaunamos tris kartus plovimo tirpalais, po kiekvieno jų kartojant centrifugavimo procedūrą. Gauti intarpiniai kūneliai užšaldomi.

Naudota įranga:

- Aukšto slėgio homogenizatorius *Niko Soavi S.p.A NS 1001-L PANDA*;
- Centrifuga *Beckman Avanti J-25*.

Atšildyti intarpiniai kūneliai tirpinami disulfidinius ryšius ardantomis sąlygomis.

Atliekamas tikslinio baltymo pakartotinis sulankstymas į aktyvią formą naudojant oksiduoto ir redukuoto gliutationų sistemą. Po pakartotinio sulankstymo gaunamas B-C1 mėginys.

3.6. Dietilaminoetilsafarozės (DEAE Sapharose) jonų mainų chromatografija

Baltyminis tirpalas po baltymo pakartotinio sulankstymo koncentruojamas ultrafiltravimo/diafiltravimo sistema. Gaunamas mėginys B-D3. Sukoncentruotas baltyminis tirpalas frakcionuojamas naudojant DEAE jonų mainų chromatografiją. Baltyminis tirpalas standartizuojamas ir gaunamas mėginys B-F1.

Naudota įranga:

- Ultrafiltravimo/diafiltravimo sistema *Sartorius Sartoflow Smart*;
- Chromatografas *GE Healthcare AKTA Explorer*;
- Chromatografinė kolonėlė *GE Healthcare XK 2,6x70 cm*.

3.7. Analitiniai metodai

Atvirkščios fazės, aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (RP-HPLC)

Atvirkščios fazės, aukšto efektyvumo skysčių chromatografijos metodu buvo testuojami tarpiniai gryninimo mėginiai po DEAE jonų mainų chromatografijos, mėginys B-F1. Šiuo metodu buvo nustatomas tikslinio baltymo priemaišos ir jų lygis.

Naudota įranga:

- HPLC chromatografas *Waters E2695*;
- UV detektorius *Waters 2489 UV Detector*;
- HPLC kolonėlė *Waters XBridge BEH C18, 300Å, 5µm, 4,6x250 mm*.

Elektropurkštutinės jonizacijos masių spektrometrija (ESI-MS)

Kombinuotas RP-HPLC ir ESI-MS metodas buvo taikomas norint detaliau ištyrinėti rastas tikslinio baltymo priemaišas, ko negali padaryti vien tik RP-HPLC. Šiuo analitiniu metodu buvo testuojami mėginiai po baltyminio tirpalo koncentravimo, mėginys B-D3. Mėginys buvo frakcionuojamas naudojant RP-HPLC analizės metodą, o pagrindinė tikslinio baltymo ir RRT 1,10 frakcijos analizuotos ESI-MS metodu, nustatant baltymų molekulinės mases.

Be to RP-HPLC ir ESI-MS buvo naudojamas taikant peptidinio žemėlapiu analizės metodą. Izoliuotos tikslinio baltymo ir RRT 1,10 frakcijos, buvo paveiktos Glu-C proteaze ir susidarę skilimo produktai analizuojami ESI-MS metodu. Gauti duomenys panaudoti nustatant kaip RRT 1,10 frakcijoje esantis baltymas yra modifikuotas.

Naudota įranga:

- Chromatografinė sistema *Dionex Ultimate 3000 RSL Cnano*;
- Masių spektrometras *Bruker Maxis 4G*.

3.8. Statistiniai metodai

Pilnas faktorinis planas

Trūkstatų elementų identifikavimui buvo naudojamas pilnas faktorinis planas. Šis metodas leidžia įvertinti ne tik pasirinktų faktorių įtaką norimam atsakui, bet ir faktorių tarpusavio sąveiką. Tyrime buvo naudotas 2^3 faktorinis eksperimentų dizainas, t.y. kiekvienas iš trijų pasirinktų faktorių gali turėti dvi būsenas, todėl priklausomybė tarp faktoriaus ir atsako skaičiuojama taikant tiesinės regresijos modelį, o geriausiai duomenis atitinkantis modelis

parenkamas naudojant mažiausių kvadratų metodą (Rathore ir Mhatre, 2009). Eksperimento plano sudarymui ir duomenų apdorojimui buvo naudojama kompiuterinė programa JMP 10.

Visą bakterijų augimo kreivę aprašyti matematinio modeliu labai sunku, nes nėra vieno modelio tinkančio visiems variantams. Tačiau vieną, pačią svarbiausią dalį – eksponentinio augimo fazę, galima lengvai aprašyti matematinio modeliu ir gauti matematinės vertes, kurias galima lyginti tarpusavyje. Augimo koeficientas μ aprašo augimo kreivės eksponentinės dalies statumą, kuris rodo, kaip intensyviai dalinasi ląstelės. Šis koeficientas skaičiuojamas pagal formulę: $\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1}$ (Widdel, 2010).

LINEST funkcija

Nustatant priklausomybę tarp geležies koncentracijos mielių ekstrakto ir biomasės išėigos buvo naudojama LINEST funkcija Microsoft Excel kompiuterinėje programoje. Ši funkcija geba rasti duomenis labiausiai atitinkantį modelį (tiesinį, kvadratinį ir t.t.) taikant mažiausių kvadratų metodą (Microsoft, 2019). Kadangi šio tyrimo atveju naudota kvadratinė funkcija, medelis apskaičiuotas pagal formulę: $= \text{LINEST}(y1:y2; x1:x2)^{\{1\2\}}; \text{TURE}; \text{TRUE}$

Tiesinės regresijos modelis

Norint rasti skirtumą tarp laboratorinės ir gamybinės skalių buvo naudojamas tiesinės regresijos modelis (Rathore ir Mhatre, 2009). Regresijos modelis buvo skaičiuojamas naudojantis Microsoft Excel kompiuterinės programos „Regression“ funkcija.

4. REZULTATAI

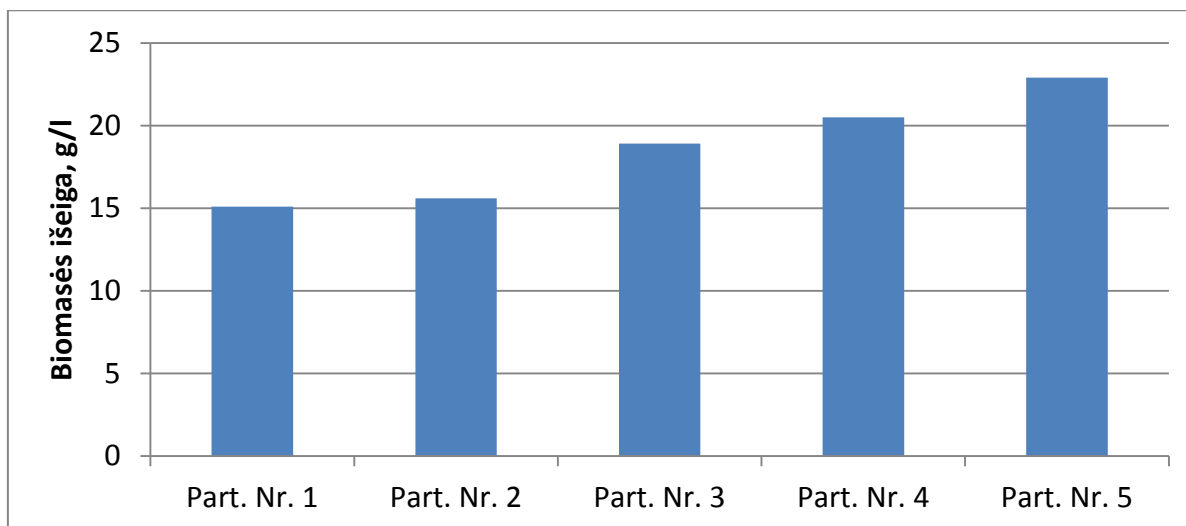
4.1. Trūkstančių elementų identifikavimas

E. coli K802/pT7a-GCSF fermentacijos procese yra naudojama pusiau sintetinė terpė, o biomasės kiekio sumažėjimas siejamas su mielių ekstrakto partijos pasikeitimu, todėl visas dėmesys buvo sutelktas į mikroelementus, vitaminus ir kitus augimo faktorius, būtinus bakterijų augimui. Pagal UAB Sicor Biotech užsakymą, mielių gamintojas atliko penkių skirtingų partijų mielių ekstrakto elementinę analizę (masių spektrometrija) (**4.1 lentelė**).

4.1 lentelė. Penkių skirtingų mielių ekstrakto partijų elementinė analizė

	Mielių ekstraktas partijos nr.1 (µg/g)	Mielių ekstraktas partijos nr.2 (µg/g)	Mielių ekstraktas partijos nr.3 (µg/g)	Mielių ekstraktas partijos nr.4 (µg/g)	Mielių ekstraktas partijos nr.5 (µg/g)
Natris	3898	3521	4003	4567	5359
Magnis	1225	1110	1084	832	1114
Fosforas	12881	13423	12900	11974	10134
Siera	8163	7898	8009	7803	8933
Kalis	49379	49284	49824	44213	47941
Kalcis	574	835	778	1023	1314
Aliuminis	1,00	<1,00	<1,00	1,17	1,33
Vanadis	0,211	0,190	0,241	0,230	0,237
Chromas	<0,168	<0,168	<0,168	<0,157	0,192
Manganas	1,17	1,18	2,20	1,70	2,86
Geležis	30,5	30,9	37,4	45,8	49,1
Kobaltas	1,78	2,08	1,80	1,77	1,71
Nikelis	0,263	0,220	0,237	0,221	0,315
Varis	0,713	0,712	0,748	1,52	2,09
Cinkas	109	98,3	93,7	108	125

Su tomis pačiomis mielių ekstrakto partijomis buvo atliktos ir 5 fermentacijos, kiekvienoje jų naudojant vis kitos partijos mielių ekstraktą (žiūrėti **4.1 pav.**).



4.1 pav. Fermentacijų, kuriose buvo naudojamos skirtingų partijų mielių ekstraktas, biomasės išeiga

Lyginant elementų kiekius mielių ekstrakto ir fermentacijų biomasės išeigos buvo ieškoma koreliacija, tarp šių dviejų dydžių. Didžiausia koreliacija buvo rasta tarp biomasės išeigos ir šių metalų: geležies – **0,98**; natrio – **0,92**; vario – **0,91**; mangano – **0,90** ir kalcio – **0,90**.

Iš šių elementų natrio buvo atmestas pirmiausiai, nes mielių ekstraktas nėra pagrindinis natrio šaltinis naudojamoje terpėje, kur kas didesnis jo kiekis į terpę patenka iš di-natrio vandenilio fosfato dodekahidrato, kazeino hidrolizato ar natrio šarmo. Iš ankstesnių tyrimų buvo žinoma, kad papildomas kalcio pridėjimas į terpės sudėtį, neįtakoja šio producento augimo, tuo tarpu papildomas mangano druskų kiekis ženkliai pagerina augimą ir biomasės išeigą, todėl tolimesniam tyrimo etapui buvo pasirinkti trys elementai: geležis, manganas ir varis.

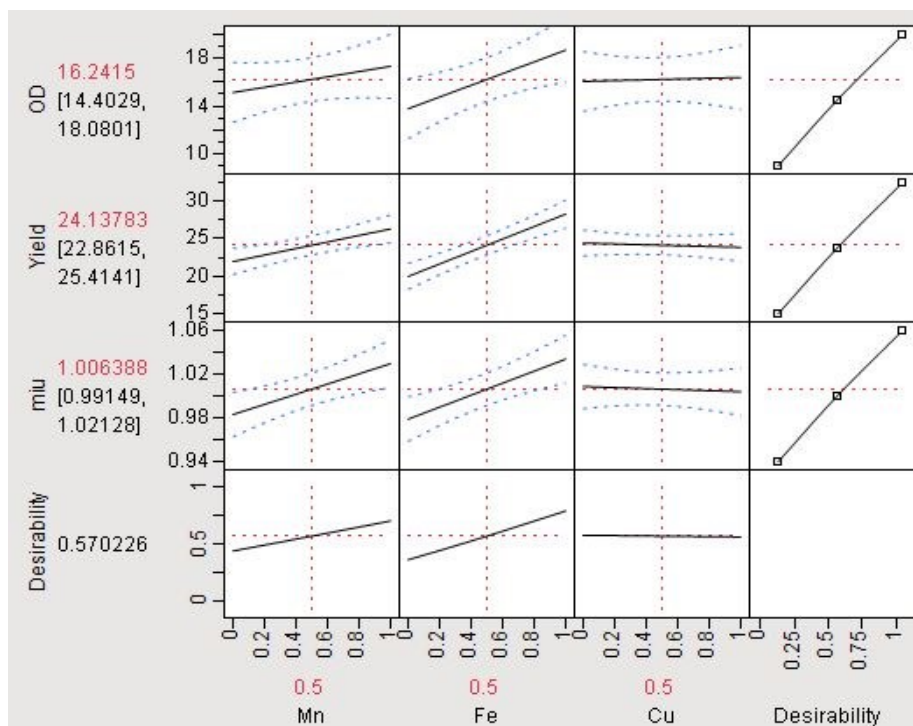
Siekiant įvertinti šių elementų galimai kompleksinę įtaką, tolimesnis tyrimas buvo atliekamas naudojant pilną faktoriinį eksperimentų planą (**4.2 lentelė**). Kaip geležies šaltinis buvo pasirinktas geležies sulfato heptahidratas ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), mangano – mangano chlorido tetrahidratas ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$), vario – vario sulfato pentahidratas ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$). Į terpę dedamų elementų koncentracija buvo pasirinkta atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas. Kaip eksperimento atsakas buvo pasirinkti trys parametrai: optinis tankis fermentacijos pabaigoje, biomasės išeiga ir augimo koeficientas.

4.2 lentelė. Pilnas faktorinis eksperimentų planas

Eksperimento Nr.	MnCl ₂ x 4H ₂ O 0,011 g/l	FeSO ₄ x 7H ₂ O 0,011 g/l	CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,5 mg/l
1	+	-	-
2	-	+	-
3	-	-	+
4	+	+	-
5	+	-	+
6	-	+	+
7	+	+	+
8	-	-	-

+ medžiaga pridėta į terpę.
- medžiaga neprisidėta į terpę.

Rezultatai parodė, kad varis ar jo sąveika su kitais tirtais metalais neturi įtakos nei galutiniam optiniam tankiui, nei biomasės išeigai, nei augimo koeficientui (4.2 pav.). Tuo tarpu manganas turėjo statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) įtaką biomasės išeigai ir augimo koeficientui (4.3 lentelė). Divalentės geležies statistiškai reikšminga įtaka buvo matoma visiems trimis tirtiems parametrams, o geležies ir mangano sąveika, pasireiškė dar didesne įtaka biomasės išeigai, nei kiekvienas elementas pavieniui. Apskaičiuoti modeliai kone idealiai atitiko gautus duomenis. Varis buvo atmestas kaip neturintis įtakos šio kamieno augimui ir tolimesniuose tyrimuose tirtas divalentės geležies ir mangano poveikis.



4.2 pav. Pilno faktorinio plano eksperimentų rezultatai

4.3 lentelė. Efekty modelių statistinis patikimumas

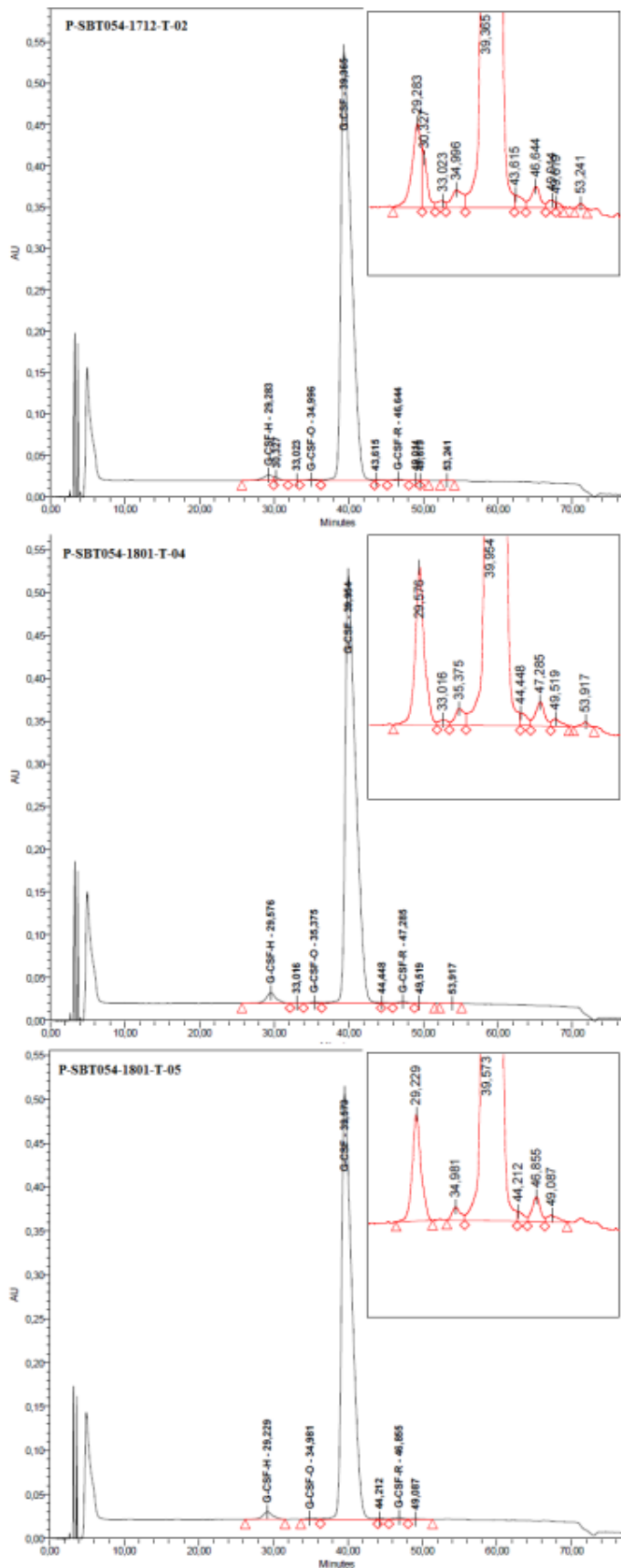
Faktorius	OD fermentacijos pabaigoje, Prob> t 	Biomosės išeiga, Prob> t 	Augimo koeficientas (μ), Prob> t
Intercept	0,0007	0,0002	<0,0001
Mn(II)	0,1238	0,0181	0,0213
Fe(II)	0,0290	0,0050	0,0155
Cu(II)	0,7314	0,4342	0,5653
Mn(II)*Fe(II)	0,0982	0,0361	0,2407
Mn(II)*Cu(II)	0,5631	0,1840	0,2379
Fe(II)*Cu(II)	0,8752	0,5361	0,1581
R²	0,97	0,99	0,98

Siekiant išsiaiškinti ar pridėtas papildomas kiekis geležies ir mangano, ar padidėjęs augimo greitis ir biomasės išeiga neturi įtakos tikslinio baltymo kokybei buvo atliktos dvi papildomos 5L fermentacijos į terpę pridedant kiekvieno iš metalų (**4.4 lentelė**). Iš gautų biomasių buvo išgrynintas tikslinis baltymas ir atliktos RP-HPLC ir RP-HPLC/MS analizės. RP-HPLC metodu tirtas mėginys po dietilaminoetilsafarozės (DEAE) jonų mainų chromatografijos B-F1, o RP-HPLC/MS metodu mėginys prieš DEAE jonų mainų chromatografiją B-D3.

4.4. lentelė. Fermentacijų ir gryninimo serijų numeriai

Pridėtas metalas / kiekis	Fermentacijos serijos Nr.	Gryninimo serijos Nr.
Mn ²⁺ / 0,011 g/l	F-GCSF-1801-T-01	P-SBT054-1801-T-04
Fe ²⁺ / 0,011 g/l	F-GCSF-1801-T-02	P-SBT054-1801-T-05
-	F-GCSF-1612-T-02 ¹	P-SBT054-1712-T-02

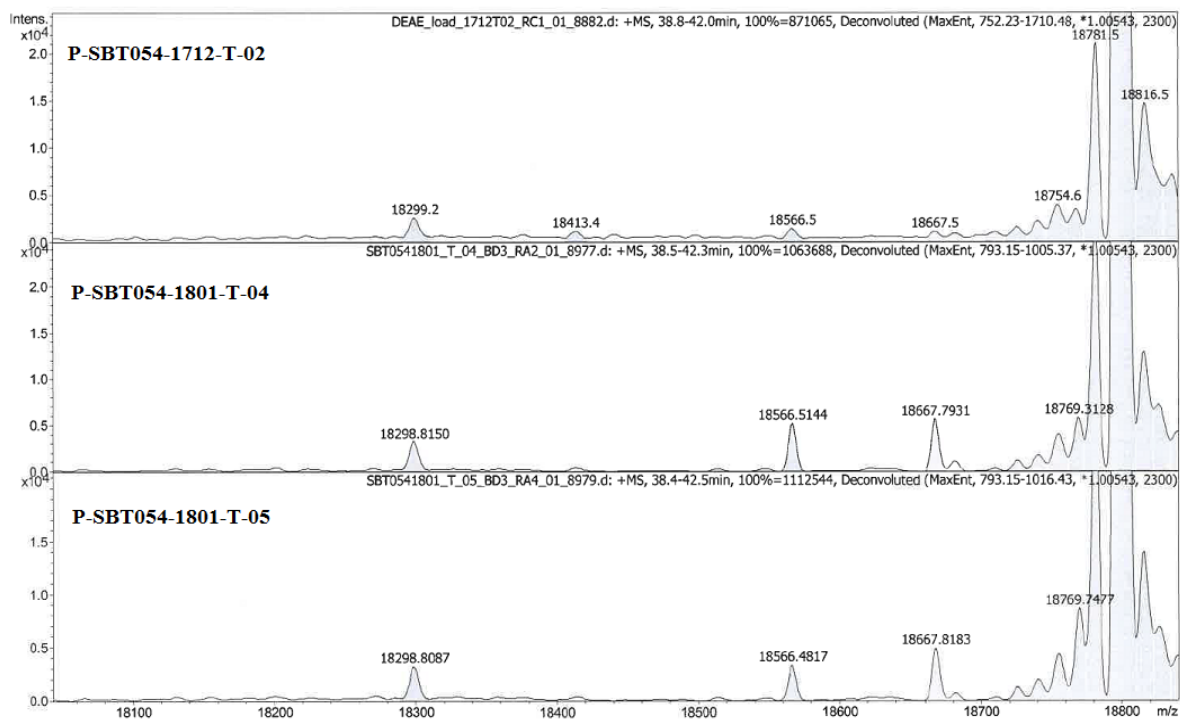
¹. Kontrolinė serija. Fermentacija su tipiniais parametrais.



4.3 pav. B-F1 mėginių RP-HPLC chromatogramos

Atvirkščios fazės aukšto efektyvumo skysčių chromatografija (RP-HPLC) neparodė jokių priemaišų atsiradusių dėl papildomo geležies ar mangano pridėjimo ir kurie nebūtų pašalinti DEAE jonų mainų chromatografijos metu (4.3 pav.). Taip pat žinomų priemaišų, tokių kaip oksiduotos formos (GCSF-O), RRT 1,10 ar triptofaninio adukto (GCSF-R) kiekiai išliko tokie patys, kaip ir kontrolinėje serijoje.

Taip pat buvo atlikta mėginio prieš DEAE chromatografiją analizė RP-HPLC metodu, o tikslinio baltymo smailė detaliau patyrinėta masių spektrometrijos būdu. Šis tyrimas parodė, kad serijose, kuriose buvo papildomai pridėta geležies ir mangano pagrindinėje smailėje yra trys mažesnės molekulinės masės baltymai (4.4 pav.), o jų kiekis minėtose serijose ženkliai išaugęs lyginant su kontroline serija. Nustačius šių baltymų masę ir palyginus duomenis su GCSF peptidiniu žemėlapiu nustatyta, kad tai trys tikslinio baltymo modifikacijos, kur baltymo N gale trūksta 1-os, 2-iejų ir 5-ių aminorūgščių (4.5 lentelė).



4.4 pav. B-D3 mėginių RP-HPLC/MS analizės rezultatai

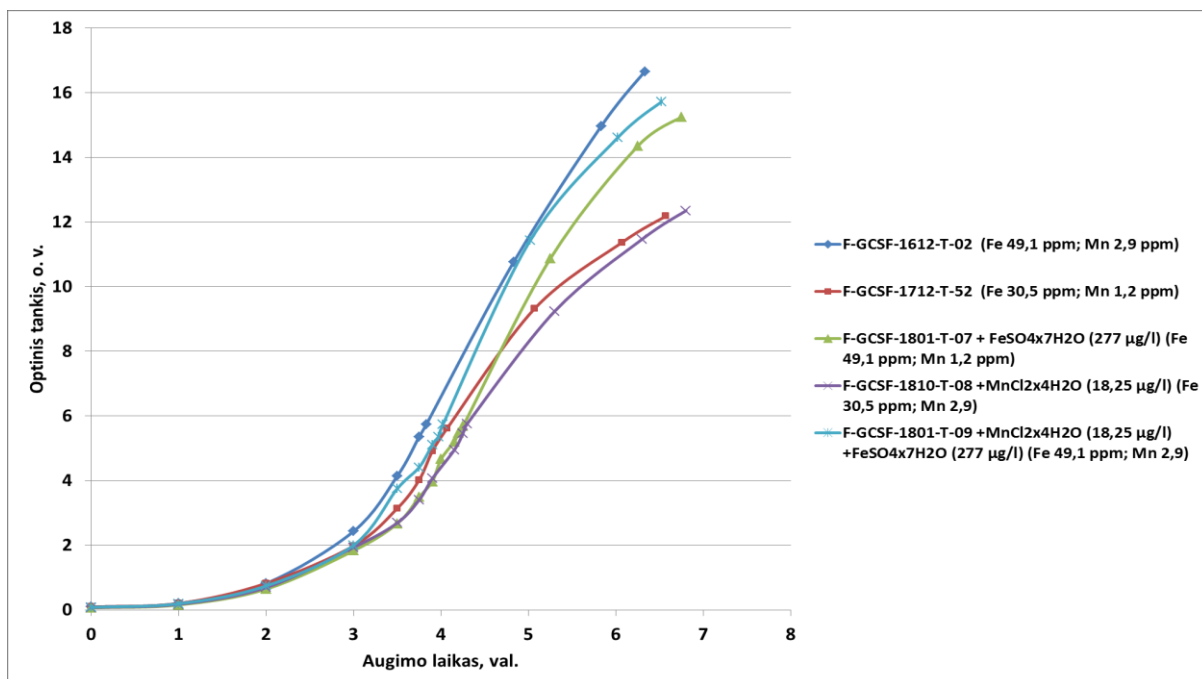
4.5 lentelė. Mažesnės molekulinės masės baltymai rasti tikslinio baltymo smailėje

Prarastas sekos fragmentas	N-galas	Masės pokytis, Da	Baltymo masė, Da
Pilnas baltymas	Met-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-...	0.00	18798,8934
-Met	Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-...	-131,1986	18667,8183
-Met-Thr	Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-...	-232,3037	18566,4817
-Met-Thr-Pro-Leu-Gly	Pro-Ala-Ser-Ser-...	-499,6319	18298,8087

Siekiant rasti tinkamą geležies ir mangano koncentraciją mielių ekstrakte, kuri atstotų fermentacijos parametrus į tipinį lygį, tačiau negeneruotų priemaišų (4.4 pav.), buvo atliktos trys 2L fermentacijos, kuriose buvo atkurtas geležies ir mangano lygis į randamą „gerame“ mielių ekstrakte (4.6 lentelė), į terpę pridedant atitinkamą kiekį, šių metalų druskų. Metalų lygis atkurtas remiantis gamintojo atlikta elementinę analizę (4.1 lentelė, Mielių ekstraktas partijos nr. 5).

4.6 lentelė. Fe ir Mn koncentracija terpėje tenkanti 1 g mielių ekstrakto

Serijos Nr.	Geležies konc. (µg/g)	Mangano konc. (µg/g)	Komentaras
F-GCSF-1612-T-02	49,1	2,86	Tipinis mielių ekstraktas
F-GCSF-1712-T-52	30,5	1,17	Kontrolinė serija
F-GCSF-1801-T-07	49,0	1,17	Atkurta geležies koncentracija
F-GCSF-1801-T-08	30,5	2,86	Atkurta mangano koncentracija
F-GCSF-1801-T-09	49,1	2,86	Atkurta abiejų metalų koncentracija



4.5 pav. Fermentacijų, su atkurtu Fe ir Mn kiekiu, augimo kreivės

Į pradinį lygį atkurta mangano koncentracija didesnio poveikio augimui neturėjo (4.5 pav.) – augimas labai panašus į kontrolinės serijos. Tuo tarpu atkurta geležies koncentracija ženkliai pagerino augimą, optinis tankis fermentacijos pabaigoje 25% didesnis nei kontrolinės serijos, tačiau nepasiekė tipinio lygio – 9% mažesnis. Serijoje, kurioje buvo atkurta abiejų metalų koncentracija stebėtas dar geresnis augimas – 29%, nei serijoje su geležimi. Kone identiški rezultatai gauti ir su biomasės išeiga.

Išanalizavus duomenis buvo pastebėta, kad pavieniui manganas neturi jokio efekto, tuo tarpu esant kartu su geležimi – efektas gana ryškus. Buvo iškelta hipotezė, kad manganas ir geležis turi tokį pat veikimo mechanizmą, tačiau tik pridėdant mangano, jo kiekis labai mažas (5 µg), ir pastebėti jo įtaką, esant tokiam proceso variabilumui, labai sudėtinga.

Tam, kad patikrinti šią hipotezę, į terpę buvo pridėtas toks mangano kiekis, kad bendras geležies ir mangano kiekis būtų toks pats, koks randamas „gerame“ mielių ekstrakte – 50,2 µg/g (4.7 lentelė), o rezultatas palygintas su serija, kurioje yra toks pat geležies kiekis.

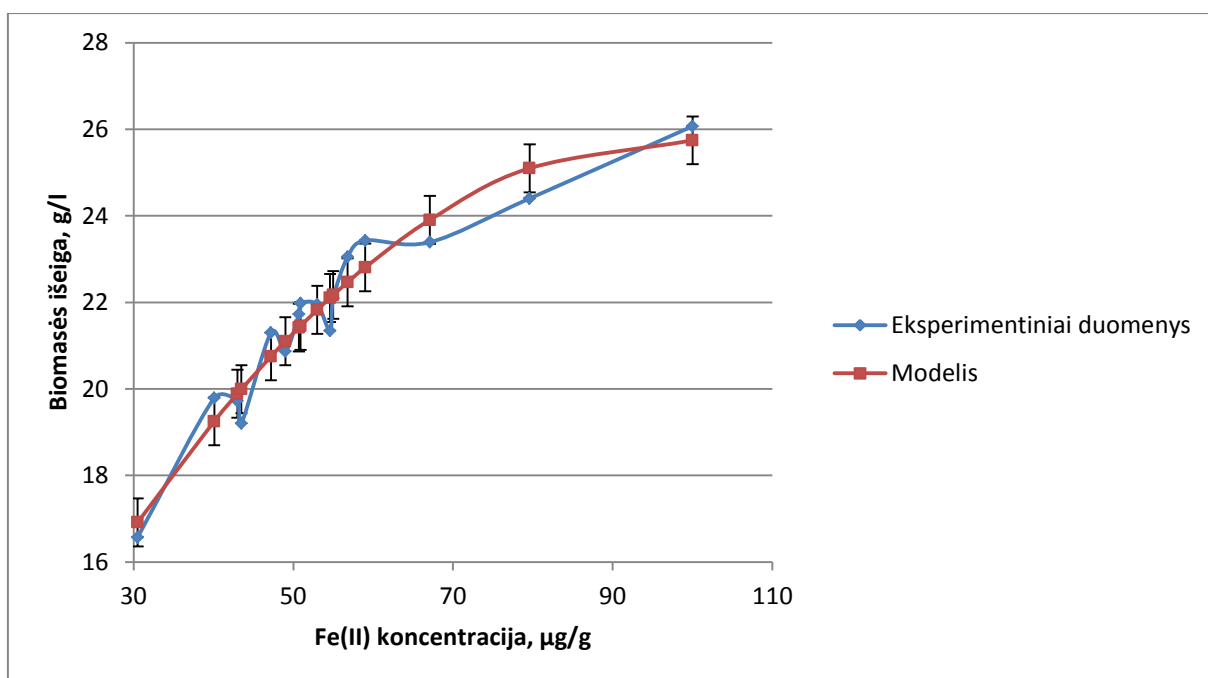
4.7 lentelė. Fe, Mn ir abiejų elementų suminė koncentracija tenkanti 1g mielių ekstrakto

Serijos Nr.	Geležies kiekis (µg/g)	Mangano kiekis (µg/g)	Abiejų metalų kiekis (µg/g)	Optinis tankis fermentacijos pabaigoje (o. v.)	Biomasės išeiga (g/l)
F-GCSF-1801-T-07	49,1	1,17	50,2	15,25	20,87
F-GCSF-1802-T-13	30,5	19,69	50,2	15,17	21,48
Skirtumas (%)				0,5%	2,9%

Gauti rezultatai patvirtino iškeltą hipotezę – mangano poveikis yra toks pat, kaip ir geležies. Optinis tankis fermentacijos pabaigoje minėtose fermentacijose beveik identiškas, skirtumas tik 0,5%. Biomasės išeigos skirtumas, šiek tiek didesnis, tačiau tai galima paaiškinti dar vienu kintamuoju atsirandančiu ruošiant biomasę – biomasės drėgnumas. Tolimesniuose eksperimentuose buvo atsižvelgiama tik į geležies kiekį esantį mielių ekstrakto, nes mangano kiekis jame yra nykstamai mažas (paklaidos ribose) ir sunkiai išmatuojamas (gamintojo rekomendacija).

4.2. Reikiamos koncentracijos nustatymas

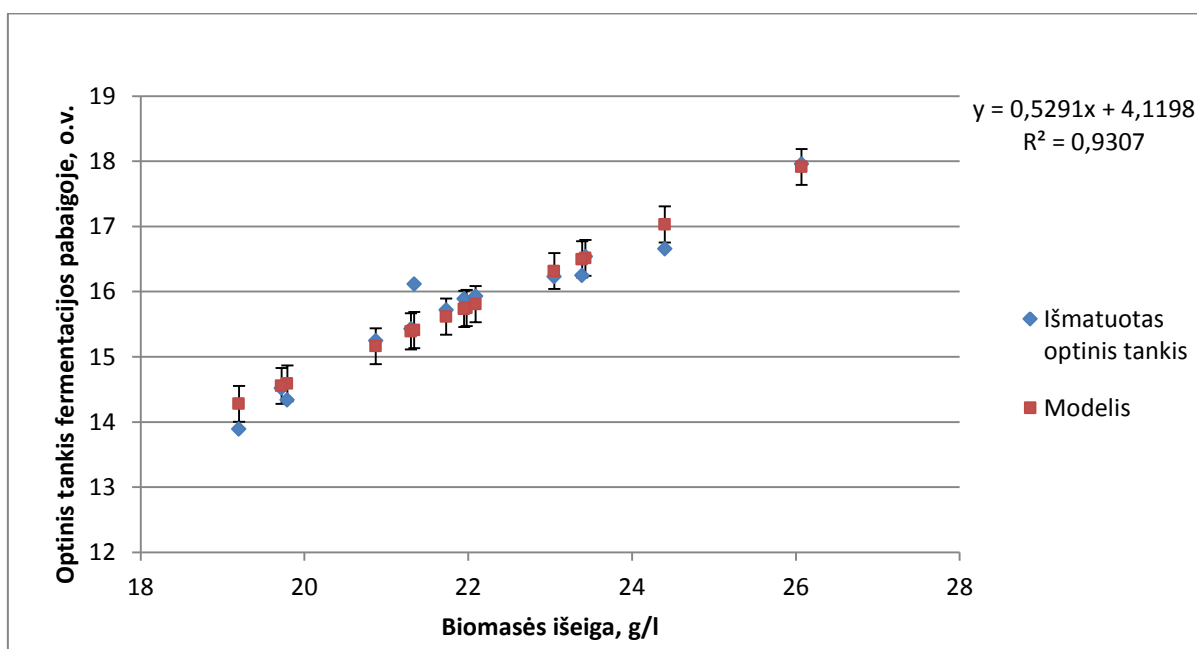
Siekiant nustatyti tikslų reikiama geležies kiekį mielių ekstrakto, kad fermentacijos parametrai būtų atstatyti į tipinį lygį ir nebūtų generuojamas RRT 1.10 tikslinio baltymo forma, buvo atlikta 17 fermentacijų su skirtingomis divalentės geležies jonų koncentracijomis. Analizėje naudoti ir fermentacijų, į kurias buvo įdėtas papildomas mangano kiekis duomenys, tačiau dėl vienodo geležies ir mangano veikimo, naudotas suminis šių metalų kiekis buvo laikomas kaip geležis. Pasitelkus Microsoft Office Excel programinę įrangą, su LINEST funkcija, kuri taiko mažiausių kvadratų metodą modeliui sudaryti, buvo rasta priklausomybė tarp suminio šių metalų kiekio ir fermentacijos biomasės išeigos (**4.6 pav.**) Gautą priklausomybę galima aprašyti formule: $y = -0,00194x^2 + 0,38074x + 7,10966$, kur x – Fe^{2+} jonų koncentracija mielių ekstrakto ($\mu g/g$), y – biomasės išeiga (g/l). Modelio koreliacija su eksperimentiniais duomenimis didelė: $R^2=0,95$, o galima paklaida: $SD=0,55$.



4.6 pav. Biomasės išeigos priklausomybė nuo geležies jonų koncentracijos mielių ekstrakto

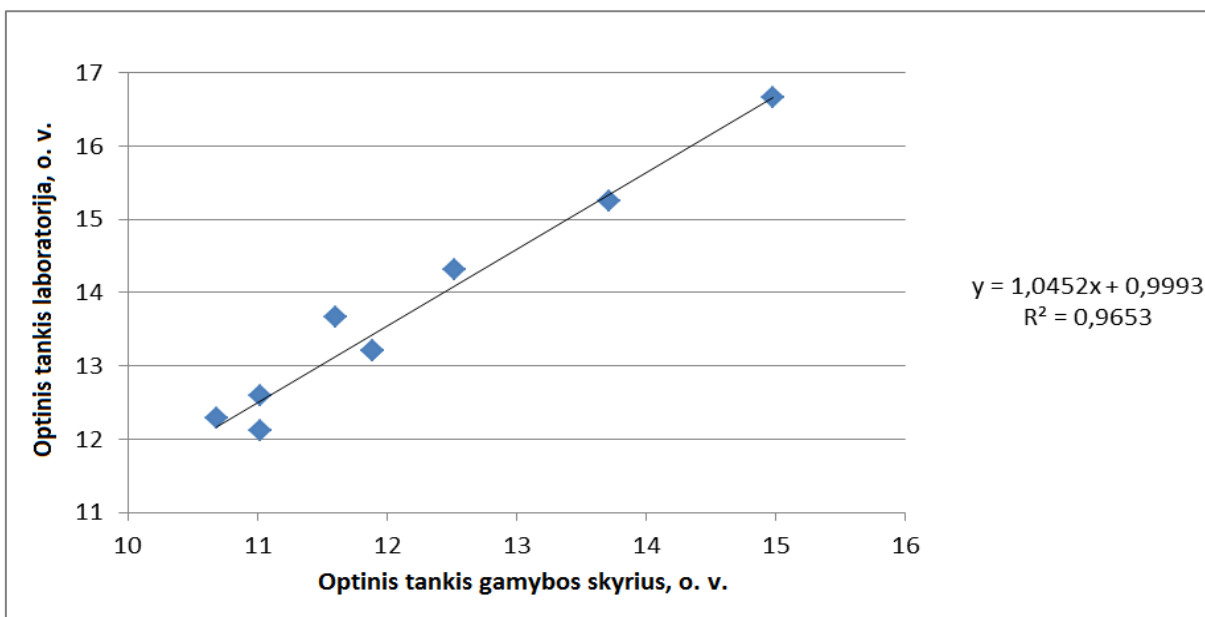
Pagrindinis šio tyrimo tikslas buvo atstatyti fermentacijos parametrus į tipinį lygį ir siekiant atitikti regulatorinius reikalavimus, kaip atskaitos taškas pasirinktas geležies kiekis randamas mielių ekstrakte partijos nr. 5 – 49 µg/g. Eksperimentai buvo atliekami 2-5L fermentatoriuose, tuo tarpu produkto gamyba vyksta 300L fermentatoriuje, todėl norint nustatyti ar šis geležies kiekis generuos biomasės kiekį ir išeią atitinkančią specifikacijos reikalavimus gamybinėje skalėje, būtina atsižvelgti į skalės skirtumus.

Visų pirma pasitelkus prieš tai minėtų mažos skalės rezultatų duomenis ir tiesinės regresijos analizės metodą, buvo rasta tiesinė priklausomybė tarp dviejų pagrindinių fermentacijos parametrų – optinio tankio fermentacijos pabaigoje ir biomasės išeių (4.7 pav.).



4.7 pav. Optinio tankio fermentacijos pabaigoje priklausomybė nuo biomasės išeių.

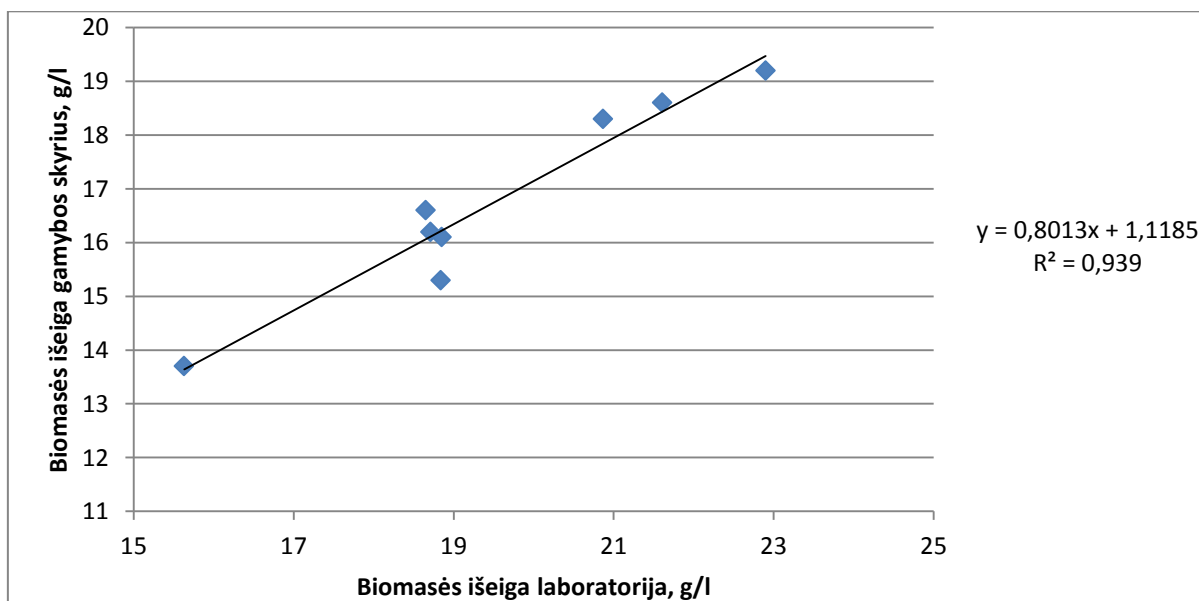
Kadangi tyrimo metu nustatyta, kad biomasės kiekis/išeią kinta priklausomai nuo geležies kiekio, o skirtingos mielių ekstrakto partijos turi skirtingą geležies kiekį savo sudėtyje, buvo analizuojami istoriniai gamybinės skalės fermentacijų duomenys, kuriuose buvo naudotas skirtingų partijų mielių ekstraktas. Rasti duomenys buvo palyginti su laboratorinės skalės fermentacijų duomenimis, kuriose buvo naudojamos tos pačios mielių ekstrakto partijos, kaip ir gamybinėje skalėje. Kadangi biomasės gamybai gamybos skyriuje ir mažos skalės laboratorijoje naudojamos skirtingo tipo centrifugos todėl atsiranda dar vienas papildomas faktorius, šių dviejų skalių palyginimui buvo pasirinktas kitas parametras – optinis tankis fermentacijos pabaigoje. Šis parametras abejais atvejais matuojamas vienodo tipo prietaisais ir taip pat yra tiesiogiai proporcingas biomasės išeių.



4.8 pav. Tiesinė priklausomybė tarp optinio tankio fermentacijos gale laboratorijoje ir gamybos skyriuke.

Iš viso buvo rastos 8 mielių ekstrakto partijos, su kuriomis būtų atliktos fermentacijos tiek gamybos skyriuje, tiek ir mažos skalės laboratorijoje (**4.8 pav.**). Palyginus šių serijų optinį tankį fermentacijos gale buvo gauta aiški tiesinė priklausomybė tarp šių dviejų skalių. Duomenų koreliacija itin aukšta – $R^2=0,97$.

Kadangi tarp gamybinės ir laboratorinės skalių buvo rasta tiesinė priklausomybė, norint apskaičiuoti, kiek biomasės bus generuojama fermentacijos metu gamybos skyriuje, naudojant mielių ekstraktą, kuriame geležies koncentracija siekia 49 $\mu\text{g/g}$, buvo pasitelktas tiesinės regresijos modeliai tarp abiejų skalių biomasės išeigos (**4.9 pav.**).



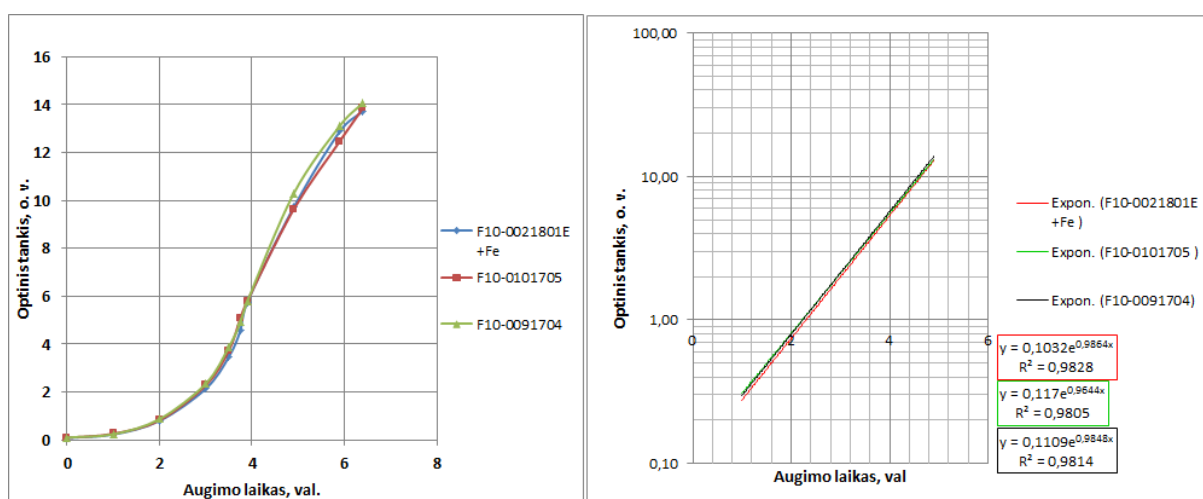
4.9 pav. Biomasės išeigos priklausomybė tarp gamybos skyriaus ir laboratorijos.

Pagal aukščiau apskaičiuotus matematinius modelius buvo nustatytas tikėtinas biomasės kiekis fermentacijoje naudojant mielių ekstraktą, kuriame geležies koncentracija siekia 49 µg/g. Taip pat gamybos skyriuje atlikta eksperimentinė serija (F3-0021801E), su atkurta geležies koncentracija mielių ekstrakto iki 49 µg/g, į terpės sudėti pridedant atitinkamą kiekį geležies sulfato heptahidrato. Rezultatai pateikti **4.8 lentelėje**.

4.8 lentelė. Apskaičiuotas ir gautas biomasės kiekis gamybos skyriuje, naudojant mielių ekstraktą, kuriame geležies koncentracija siekia 49,0 µg/g.

	Geležies koncentracija (µg/g)	Biomasės svoris (kg)
Apskaičiuota	49,0	5,41±0,15
F3-0021801E	49,0	5,50

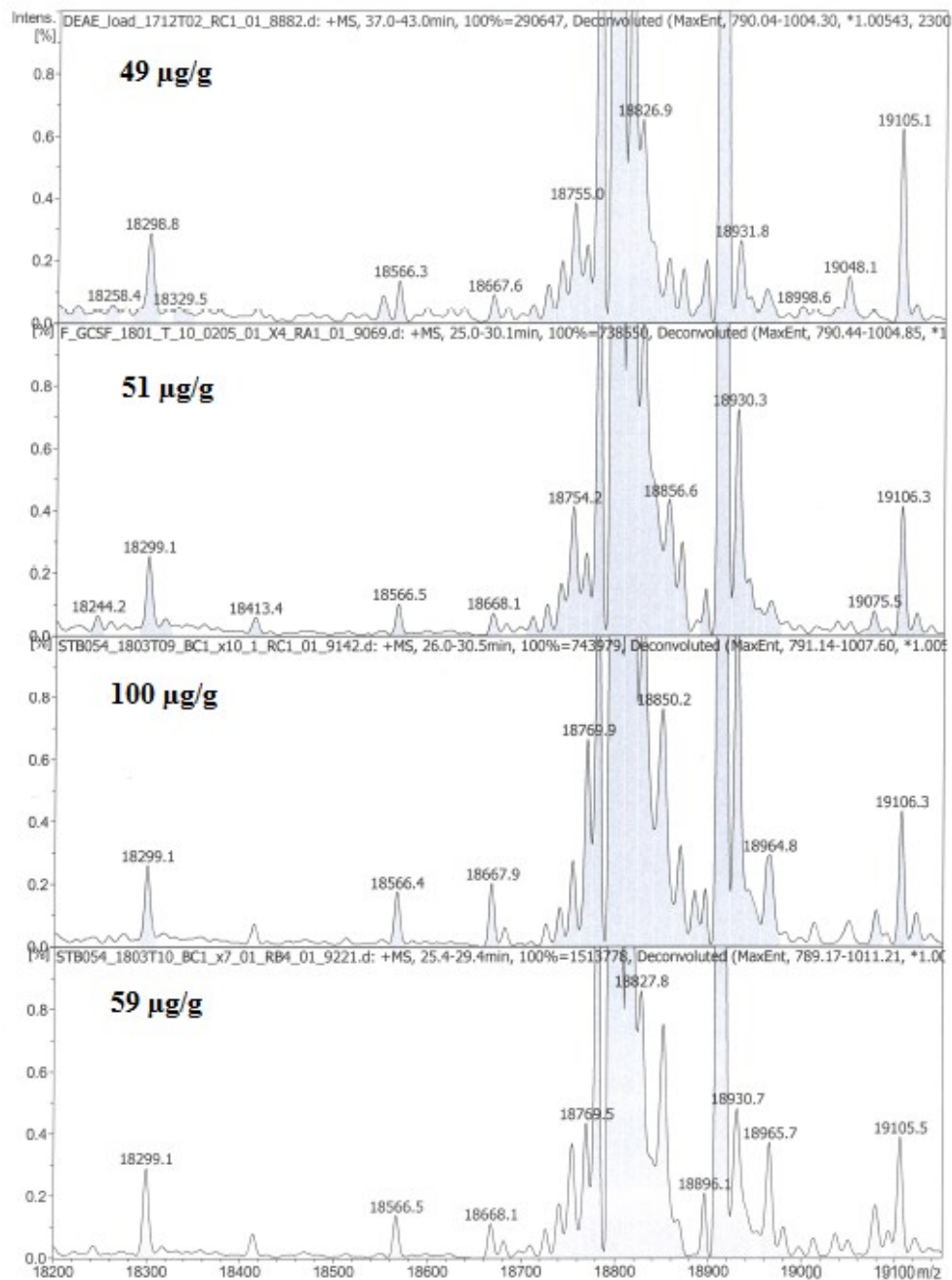
Minėta eksperimentinė serija taip pat buvo palyginta su istorinėmis serijomis, kuriose buvo naudotas mielių ekstraktas su ta pačia geležies koncentracija, kaip ir eksperimentinėje serijoje. Minėtos serijos reikšmingai nesiskyrė tiek vertinant augimo kreives, tiek augimo koeficientą (**4.10 pav.**).



4.10 pav. Didelės skalės eksperimentinės fermentacijos serijos palyginimas su tipinėmis serijomis. Augimo kreivė ir eksponentinės augimo kreivės fazė.

Kadangi pridedant į terpę didelį kiekį geležies, galutiniame produkte atsiranda priemaišų, kurios nėra pašalinamos naudojamu gryninimo metodu, iš trijų biomasių, su skirtingu geležies kiekiu, buvo atliekamas tikslinio baltymo gryninimas ir mėginiai prieš DEAE jonų mainų chromatografiją buvo išanalizuoti RP-HPLC/MS metodu.

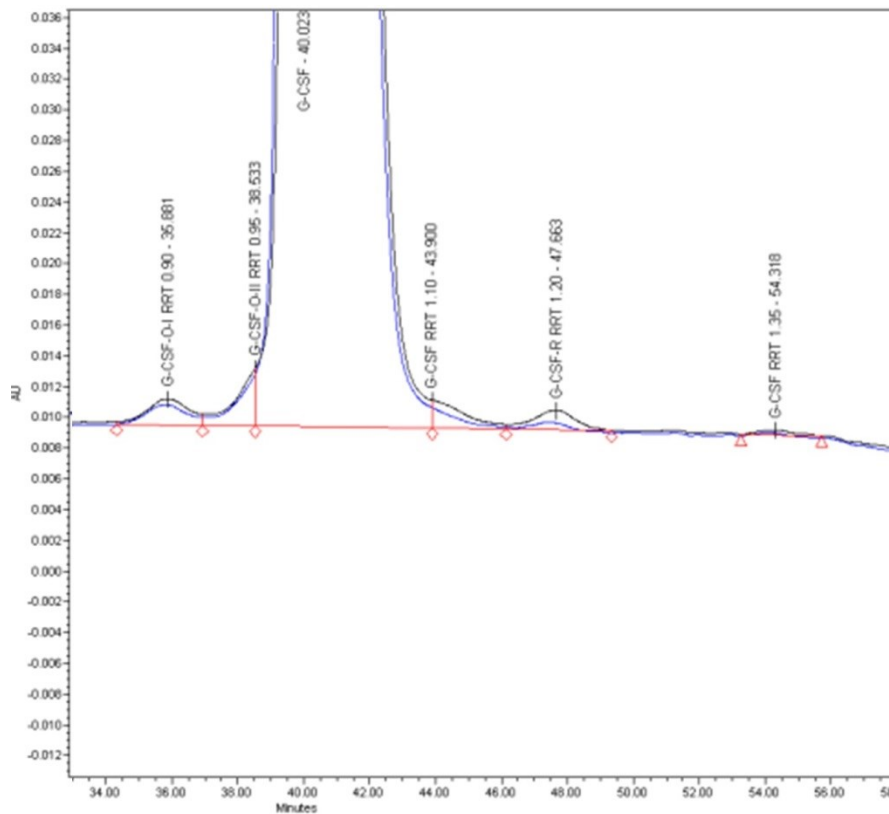
Gauti rezultatai parodė, kad nustatyta reikiama geležies koncentracija mielių ekstrakto (49 µg/g) yra tinkama (**4.11 pav.**), nes analizė neparodė mažesnės molekulinės masės tinklinio baltymo formų, kurios buvo rastos pirmoje tyrimo stadijoje. Serijoje su 59 µg/g ženklaus padidėjimo taip pat nerasta. Tuo tarpu serijoje su 100 µg/g matomas tinklinio baltymo su prarasta viena aminorūgštimi nuo N galo padidėjimas. Kitos formos, kuriose trūksta dviejų ir penkių aminorūgščių, išliko panašiam lygyje.



4.11 pav. B-D3 mėginių RP-HPLC/MS analizės rezultatai. Mėginiai gauti iš fermentacijų su skirtingomis geležies koncentracijomis tenkančiomis 1 g mielių ekstrakto.

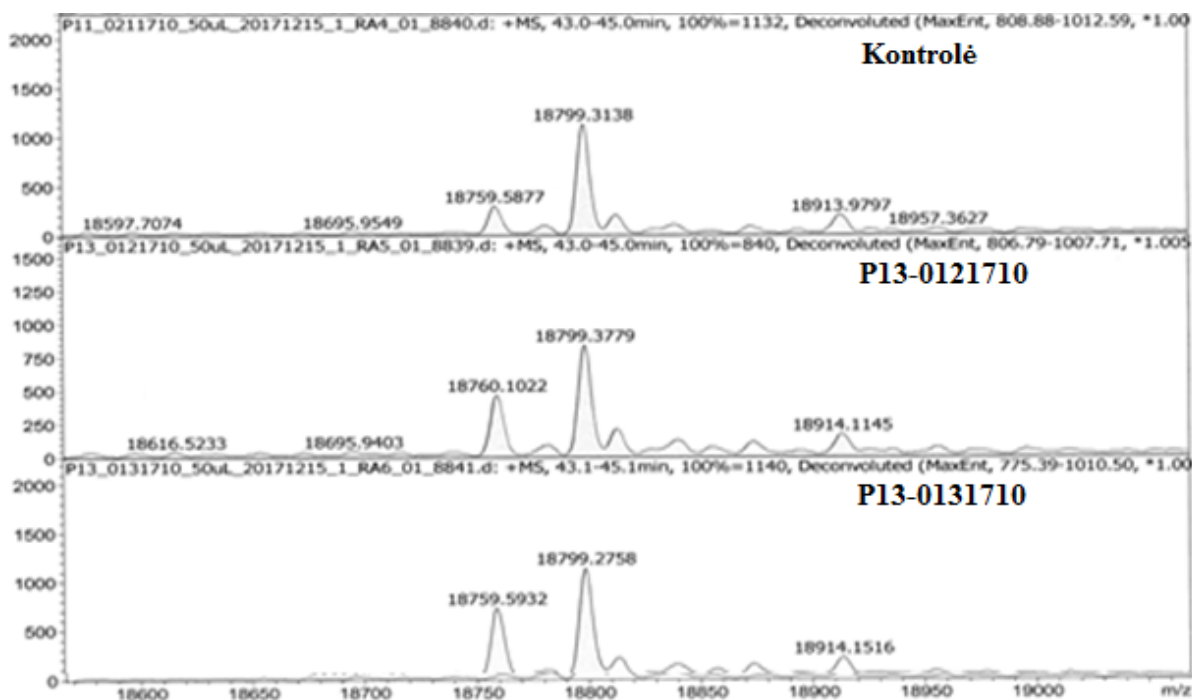
4.3. Tikslinio baltymo priemaiša RRT 1,10

Pasikeitus fermentacijoje naudojamai mielių ekstrakto partijai, buvo susidurta ne tik su biomasės išėigos problema, tačiau ir tikslinio baltymo priemaišos RRT 1,10 kiekiu padidėjimu. Ši priemaiša RP-HPLC chromatogramoje matoma visiškai šalia pagrindinės smailės (**4.12 pav.**), o naudojamas tikslinio baltymo gryninimo technologija negeba pašalinti šios priemaišos iki specifikuojamo lygio. Taip pat serijoms su didesniu kiekiu RRT 1,10 būdingas mažesnis triptofaninio adukto (GCSF-R) kiekis.



4.12 pav. RP-HPLC chromatograma. Dvi serijos su padidėjusiu RRT 1,10 kiekiu.

Priemaišos smailė buvo detaliau patyrinėta masių spektrometrijos pagalba (**4.13 pav.**). Tyrimo metu nustatyta, kad RRT 1,10 smailę sudaro du komponentai: deamidintos tikslinio baltymo formos (± 1 Da) ir nenustatyta, lengvesnė (-39 Da) tikslinio baltymo forma. Rezultatus palyginus su kontroline serija, kurioje RRT 1,10 kiekis neviršija specifikuojamos ribos, buvo nustatyta, kad RRT 1,10 smailės padidėjimą lemia išaugęs -39 Da formos kiekis, tuo tarpu ± 1 Da kiekis išlieka santykinai pastovus (**4.9 lentelė**).



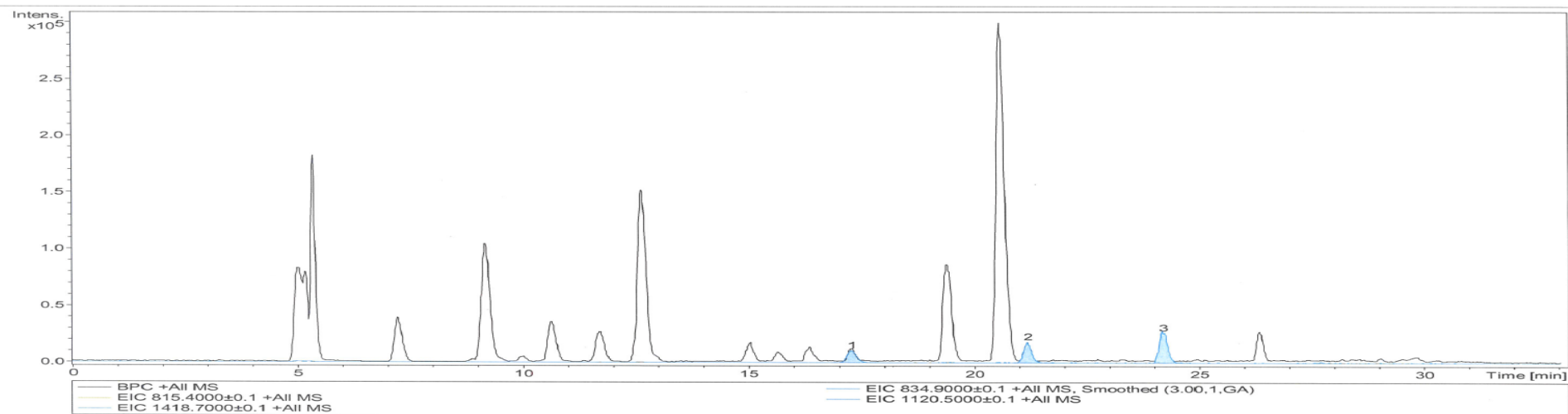
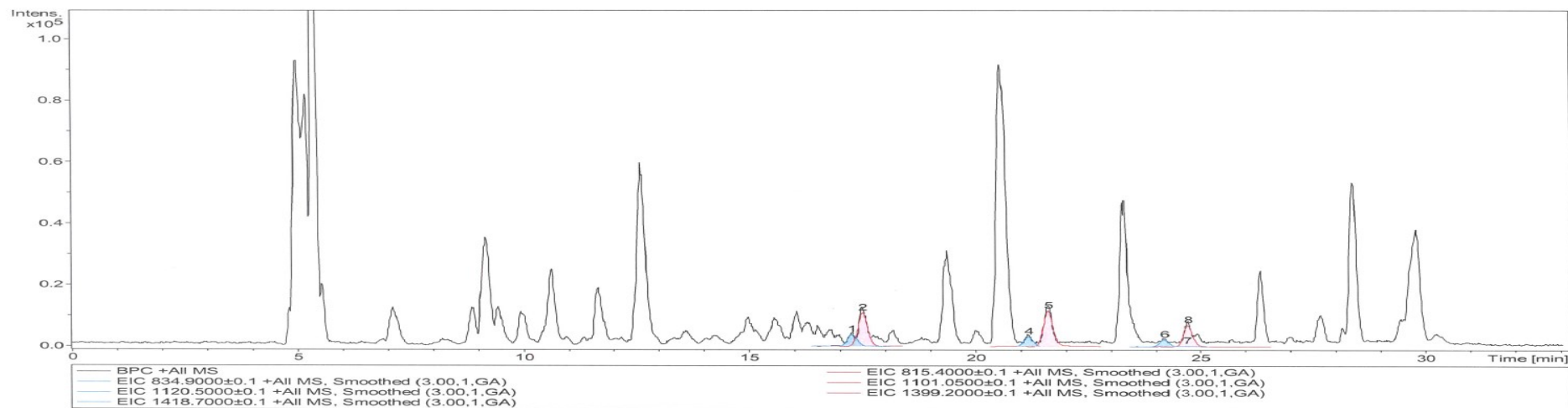
4.13 pav. RRT 1,10 smailės RP-HPLC/MS analizės rezultatai.

4.9 lentelė. RRT 1,10 smailę sudarančių komponentų santykinis aukštis.

Sulaikymo laikas	Molekulinė masė (MM), Da	MM skirtumas nuo tikslinio baltymo MM, Da	Smailės aukštis	Santykinis smailės aukštis, %
P11-0211710				
43,0– 45,0	18759,4	-39,5	294	26,0
	18798,7	-0,2	1132	100,0
P13-0121710				
44,0 – 45,0	18760,3	-38,6	461	54,9
	18799,1	0,2	840	100,0
P13-0131710				
43,1-45,1	18760,3	-38,6	742	65,1
	18799,1	0,2	1140	100,0

Norint detaliau iširti, -39 Da tikslinio baltymo formos sandarą, izoliuota RRT 1,10 smailė buvo iširta peptidinio žemėlapiu analizės metodu. Baltymo karpymui buvo naudojama Glu-C proteazė. Reakcija buvo atliekama disulfidinius ryšius ardančiomis sąlygomis (4.14 pav.). Skirtingų dydžių peptidų molekulinės masės, iš pagrindinio baltymo smailės, buvo lyginamos su tų pačių dydžių peptidų molekulinėmis masėmis iš RRT 1,10 smailės ir ieškomas teorinis peptido sekos variantas, kuris generuotų tokią pat molekulinę masę kaip ir RRT 1,10 atveju.

Iš visų galimų sekos variantų, didžiausią peptidų molekulinės masės panašumą į gautą iš RRT 1,10 smailės, parodė peptidai, kurių sekos 119 pozicijoje triptofanas (W) yra pakeistas į fenilalaniną (F) (4.10 lentelė).



4.14 pav. Peptidinio žemėpalio analizės rezultatai. Pirmas grafikas – izoliuota RRT 1,10 frakcija. Antras grafikas – tikslinio baltymo frakcija. Frakcijos paveiktos Glu-C proteaze.

4.10 lentelė. Peptidų, susidariusių tikslinio baltymo ir RRT 1,10 frakcijas paveikus Glu-C protease, molekulių masių palyginimas.

Teorinė peptidų molekulinė masė (W119)			Pagrindinio baltymo smailės frakcija		RRT 1,10 smailės frakcija				Teorinė peptidų molekulinė masė (F119)	
Peptido aminorūgščių seka	$[M+2H^+]^{2+}$	Fragmento vieta	Smailė #	m/z	Smailė #	m/z	Smailė #	m/z	$[M+2H^+]^{2+}$	Peptido aminorūgščių seka
VADFATTIWQQ MEE	834.8829	111-124	1	834.8778	1	834.8804	2	815.375	815.3774	TLQLD VADFATTIFQQM EE
TLQLD VADFATTIWQQ MEE	1120.0335	106-124	2	1120.0267	4	1120.031	5	1100.526	1100.5281	VADFATTIFQQM EE
LGPTLDTLQLD VADFATTIWQQ MEE	1418.1920	100-124	3	1418.1873	6	1418.19	8	1398.685	1398.6866	LGPTLDTLQLD VADFATTIFQQM EE

4.4. Mielių ekstrakto mėginiai su atkurto geležies kiekiu

Sužinojus reikiamą geležies kiekį mielių ekstrakto – 49 µg/g, mielių ekstrakto gamintojas, pagal specialų užsakymą pagamino tris bandomuosius mėginius, kuriuose geležies kiekis turėjo tilpti į 49±5 µg/g ribas.

Visi trys mėginiai buvo pagaminti iš mielių ekstrakto su žemu geležies kiekiu į jį pridėdant atitinkamą kiekį geležies sulfato heptahidrato, kad būtų pasiekta reikiama geležies koncentracija. Mėginys Nr.1 reprezentuoja apatinę intervalo 49±5 µg/g ribą, mėginys Nr.2 – vidurinę, o mėginys Nr.3 – viršutinę. Su kiekvienu iš mėginių ir kontrole (mielių ekstraktas, iš kurio buvo pagaminti šie mėginiai) buvo atlikta fermentacija (**4.11 lentelė**). Iš gautų rezultatų matyti, kad fermentacijos su visais trim minėtais mėginiais pasiekia reikiamus fermentacijos parametrus.

4.11 lentelė. Fermentacijų, kuriose buvo naudoti mielių ekstrakto mėginiai, rezultatai.

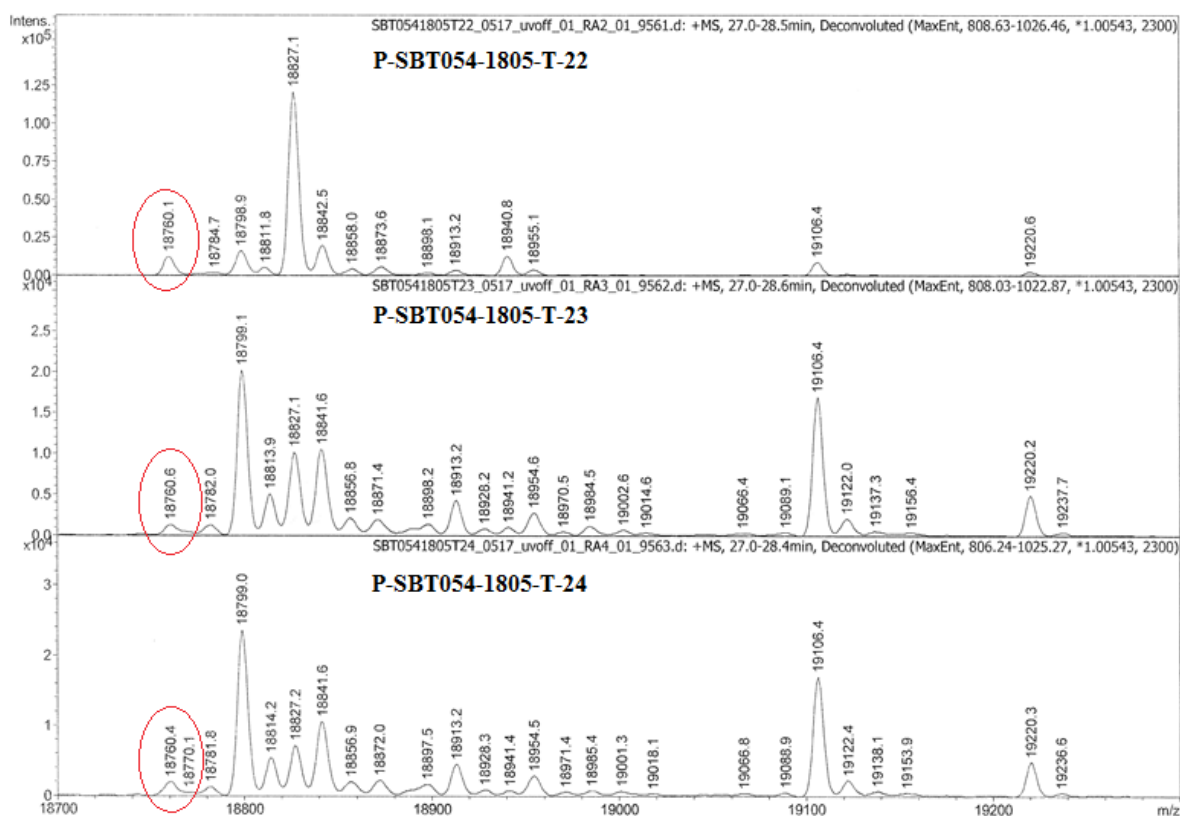
Mėginys	Serijos Nr.	Geležies kiekis, µg/g	Optinis tankis fermentacijos gale, o.v.	Biomosės išeiga, g/l
Mėginys Nr.1	F-GCSF-1805-T-46	44.4	16.09	21.93
Mėginys Nr.2	F-GCSF-1805-T-45	47.5	15.56	21.35
Mėginys Nr.3	F-GCSF-1805-T-48	51.9	15.85	22.95
Kontrolė	F-GCSF-1805-T-43	32.4	11.44	16.37

Iš minėtų biomasių taip pat buvo išgrynintas tikslinis baltymas ir mėginiai išanalizuoti su RP-HPLC ir RP-HPLC/MS sistemomis norint patikrinti ar atstatytas geležies kiekis ir fermentacijos parametrai padėjo sumažinti RRT 1,10 priemaišos kiekį. Be to buvo taip pat patikrinta ar mielių ekstrakto esantis geležies kiekis negeneruoja padidėjusio kiekio nuo N galo sutrumpėjusių tikslinio baltymo formų.

RP-HPLC ir RP-HPLC/MS analizės parodė, kad mielių ekstraktas, iš kurio buvo pagaminti minėti mėginiai generuoja labai aukštą RRT 1,10 priemaišos lygį, tačiau atkūrus geležies lygį jame iki 49±5 µg/g ribos, priemaišos kiekis sumažėja iki minimumo (**4.12 lentelė**), o tuo tarpu triptofaninio adukto kiekis padidėja (pasiekia tipinį lygį). Baltymo mutanto (W119→F119) kiekis esantis RRT 1,10 smailėje, išlieka sąlyginai žemas, lyginant su kontroline serija (**4.15 pav.**)

4.12 lentelė. RP-HPLC analizės rezultatai.

Fermentacijos/Gryninimo serijos Nr.	G-CSF- šeima, mg/ml	G-CSF-H plotas, %	G-CSF (pagrindinis) plotas, %	G-CSF RRT 1.08 Plotas, %	G-CSF RRT 1.10 plotas, %	G-CSF-R plotas, %
F-GCSF-1805-T-43 (Kont.)/ P-SBT054-1805-T-22	0.163	7.8	79.9	0.00	3.49	0.99
F-GCSF-1805-T-45 (Mid)/ P-SBT054-1805-T-23	0.233	10.4	77.1	0.24	0.57	1.57
F-GCSF-1805-T-46 (Min)/ P-SBT054-1805-T-24	0.238	11.0	77.0	0.36	0.45	1.67
F-GCSF-1805-T-48 (Max)/ P-SBT054-1805-T-26	0.223	10.6	77.8	0.00	0.63	1.57



4.15 pav. RP-HPLC/MS analizės rezultatai. RRT 1,10 smailės komponentų molekulinės masės. Raudonai pažymėtas F119 mutantas.

5. REZULTATŲ APITARIMAS

Eksperimentai parodė, kad *E.coli* K802/pT7a-GCSF fermentacijos procesą smarkiai įtakoja į terpę pridedamo geležies ir mangano jonų kiekis. Gauti rezultatai tik dar kartą patvirtino, kad šie du elementai, o ypač geležis yra vieni svarbiausių mikroelementų reikalingų bakterijų augimui (Madigan et al., 2014). Eksperimentuose naudotas pilnas faktorinis dizainas leido pastebėti, kad geležies ir mangano sąveika daro didesnę įtaką fermentacijos parametrams, nei šie du elementai pavieniui. Šie ir papildomų fermentacijų rezultatai parodė, kad geležis ir manganas, šiuo atveju, veikia identiškai, t.y. vienodos koncentracijos vienodai daro įtaką fermentacijos parametrams. Tai galima sieti su tuo, kad egzistuoja nemažai fermentų, kuriose kaip kofaktorius gali veikti tiek geležis tiek manganas (Sobota ir Imlay, 2011). Taip pat šie abu metalai labai svarbūs palaikant ląstelės atsparumą oksidaciniam stresui (Carlioz ir Touati, 1986).

Didelio kiekio geležies ir mangano jonų pridėjimas turėjo ir neigiamų pasekmių tikslinio baltymo kokybei. Masių spektrometrijos būdu nustatyta, jog pridedant šių elementų į mitybinę terpę padidėja lengvesnių tikslinio baltymo formų kiekis. Šis priemaišų atsiradimas gali būti paaiškinamas tuo, kad Fe^{2+} ir Mn^{2+} jonai nors ir įeina į superoksido dismutazių sudėtį (Lah et al., 1995; Carlioz ir Touati, 1986), didelis šių elementų kiekis citozolyje sukelia oksidacinį stresą dėl Fentono reakcijos (Koppenol, 2001; van Genuchten ir Pena, 2017). Susidarę laisvieji radikalai gali pažeisti mRNR ir sukelti klaidingą baltymo transliaciją (Tanaka et al., 2007). Detalesnis, biocheminis lengvesnių tikslinio baltymo formų atsiradimas nebuvo tirtas, tad norint išsiaiškinti mechanizmą reikalinga papildoma studija. Nors pirminių eksperimentų (faktorinis dizainas) metu buvo smarkiai viršyta reikiama šių elementų koncentracija ir tai turėjo įtakos tikslinio baltymo kokybei, tolimesniuose eksperimentuose buvo į tai atsižvelgta ir nuolat tikrinama ar naudojama šių elementų koncentracija auginimo terpėje nesukelia tikslinio baltymo priemaišų kiekio padidėjimo.

Tyrimo metu buvo susidurta su dar viena problema, pasikeitusi mielių ekstrakto partija ne tik sumažino fermentacijos biomasės išeigą, bet ir padidino RRT 1,10 priemaišos lygį. Ištyrus biomasę, į kurias buvo papildomai įdėta geležies ir mangano jonų, RP-HPLC ir RP-HPLC/MS metodais, nustatyta, kad šis priemaišos padidėjimas taip pat buvo indukuotas geležies ir mangano koncentracijos augimo terpėje. Tikėtina, kad tiek fermentacijos proceso parametrų redukciją, tiek priemaišos RRT 1,10 kiekio padidėjimą lėmė tie patys biocheminiai procesai *E. coli* ląstelėse.

Natūraliai mielių ekstrakto mangano koncentracija yra labai nedidelė, o sumažėjimas nežymus lyginant su geležimi. Didesnis mangano jonų pridėjimas į auginimo terpę būtų sunkiai pagrindžiamas, norit užregistruoti keitimą vaisto gamybos byloje, todėl tolimesniuose

eksperimentuose buvo naudota tik geležis, remiantis tuo, kad šio elemento koncentracija yra atstatoma į prieš tai buvusį lygį. Atlikus eilę fermentacijų su skirtingais geležies kiekiais buvo rasta priklausomybė tarp geležies koncentracijos mielių ekstrakto ir biomasės išeigos.

Visi eksperimentai buvo atliekami mažos skalės ir kitokio tipo bioreaktoriuose, todėl buvo būtina kvalifikuoti mažos skalės procesą, norint gauti rezultatus atsikartojančius didelėje, gamybinėje skalėje. Kaip žinoma skalės įtaka ir bioreaktoriaus tipas gali ženkliai įtakoti proceso parametrus (Crater ir Lievense, 2018). Pasitelkus istorinius duomenis ir tiesinės regresijos modelį buvo rastas skalių skirtumas, į kurį buvo atsižvelgiama pasirenkant reikiamą geležies koncentraciją. Modelio tinkamumas buvo patikrintas eksperimentinės serijos metu didelėje skalėje. Pats modelis įmonėje ir toliau buvo naudojamas kitų projektų metu ir tiriant nuokrypius.

Nustačius reikiamą geležies kiekį mielių ekstrakto, kuris atkurtų fermentacijos proceso parametrus į tipinį lygį, kartu sumažėjo ir RRT 1,10 priemaišos kiekis, taip dar kartą patvirtindamas, kad priemaišos kiekio padidėjimas buvo sąlygotas fermentacijos proceso parametrų redukcijos, t.y. geležies kiekio auginimo terpėje sumažėjimo. Ištyrus pačią priemaišą RRT 1,10 peptidinio žemėlapiu metodu nustatyta, kad ji susideda iš dviejų komponentų, o jos kiekio padidėjimą lėmė tikslinio baltymo mutanto, kuriame 119 pozicijoje triptofanas yra pakeistas kita aromatine aminorūgštimi – fenilalaninu. Taip pat pastebėta, kad kitos priemaišos, triptofaninio adukto (GCSF-R) kiekis yra atvirkščiai proporcingas RRT 1,10 kiekiui. Triptofaninis aduktas – tai tikslinio baltymo priemaiša, turinti papildomą triptofano molekulę baltymo C gale.

Tiek triptofano, tiek fenilalanino izoelektrinis taškas yra labai panašūs (Doonan, 2002), todėl tikslinio baltymo ir RRT 1,10 formos izoelektrinis taškas praktiškai identiškas. Kadangi šio produkto gryninimo technologijoje naudojama tik jonų mainų chromatografija ir gelfiltracija pašalinti RRT 1,10 priemaišą praktiškai neįmanoma. Ši priemaišą tampa pastebima tik RP-HPLC analizės metu, nes fenilalaninas pasižymi didesniu hidrofobiniškumu nei triptofanas (Doonan, 2002).

Tikslus mechanizmas, kaip geležies trūkumas sukėlė fermentacijos proceso parametrų redukciją ir padidino tikslinio baltymo mutanto kiekį nebuvo tirtas, tačiau iš turimų duomenų galima daryti prielaidas. Kadangi fermentacijos proceso parametrus į reikiamą lygį atstato ne tik papildomas geležies pridėjimas, bet ir mangano, galima iš karto atmesti tokias metabolizmo reakcijas kaip elektronų pernašos grandinė, kur geležis atlieka itin svarbų vaidmenį, o jos pakeitimas manganu šiose reakcijose neįmanomas (Flemming et al., 2003; Zhang, 1996). Turbūt geriausiai žinoma sritis, kurioje tiek manganas, tiek geležis pasižymi kone identiškomis savybėmis – oksidacinis stresas. Tyrimai rodo, kad Mn-SOD ir Fe-SOD

kompensuoja viena kitos veikimą ir inaktyvavus vieną iš jų, ląstelė nepatiria ženkliai didesnio oksidacinio streso (Carlioz ir Touati, 1986). Terpėje trūkstant geležies, indukuojamas mangano importas į ląstelę, atlaisvinama geležis surišta baltymų-saugyklų ir taip staiga padidėja laisvos Fe^{2+} ir Mn^{2+} kiekis (Seo et al., 2014), kuris dėl Fantono reakcijos sukelia ląstelei didelį oksidacinį stresą (Koppenol, 2001). Taip pat esant geležies stygiui sutrinka trikarboninių rūgščių ciklas, dėl to smarkiai rūgštėja aplinka, ląstelė suaktyvina glikolizę, bandydama palaikyti energijos atsargas ir taip dar labiau didinamas oksidacinis stresas (Seo et al., 2014). Be to geležies stygius sutrikdo tokių aminorūgščių biosintezę kaip gliutamatas (Miethke et al., 2006), kuri yra labai svarbi triptofano biosintezėje (Michal ir Schomburg, 2012) taip sukeldamas šios aminorūgšties stygių, kuris lemia sulėtėjusį ląstelių augimą, padidėjusį RRT 1,10 priemaišos kiekį ir sumažėjusį triptofaninio adukto kiekį.

6. IŠVADOS

1. Fermentacijos parametrų redukciją ir tikslinio baltymo priemaišos RRT 1,10 kiekio padidėjimas buvo sąlygotas sumažėjusio geležies kiekio, viename iš auginimo terpės sudedamųjų dalių – mielių ekstrakto.
2. Atkurta geležies koncentracija mielių ekstrakto į tipinį lygį t.y. $49 \pm 5 \mu\text{g/g}$ atstatė fermentacijos parametrus, biomasės išeigą ir optinį tankį fermentacijos gale į prieš tai buvusį lygį. Mielėse esant žemesniam geležies kiekiui kaip $44 \mu\text{g/g}$ atsiranda rizika, kad fermentacijos parametrai Gamybos skyriuje nepasieks specifikuojamo lygio. Esant didesniam divalentės geležies kiekiui nei $54 \mu\text{g/g}$ atsiranda rizika, kad biomasės išeigos specifikuojama riba Gamybos skyriuje gali būti viršyta. Fermentacijos proceso parametrai taip pat gali būti atstatyti į prieš tai buvusį lygį į terpę pridedant atitinkamą kiekį mangano jonų.
3. Esant žemesniam geležies kiekiui mielių ekstrakto nei $44 \mu\text{g/g}$ stebimas RRT 1,10 tikslinio baltymo priemaišos kiekio padidėjimas. Pasiekus $49 \pm 5 \mu\text{g/g}$, RRT 1,10 priemaišos kiekis atitinka reikalavimus. Didesnė divalentės geležies ar divalenčio mangano koncentracija nei $59 \mu\text{g/g}$ pradeda generuoti mažesnės molekulinės masės tikslinio baltymo formas.
4. RRT 1,10 priemaiša yra sudaryta iš deamidintų tikslinio baltymo baltymo formų ($\pm 1 \text{ Da}$) ir tikslinio baltymo mutanto (-39 Da), kuriame 119 pozicijoje, triptofanas yra pakeistas kita aromatine aminorūgštimi – fenilalaninu. Šio mutanto pašalinimas gryninimo proceso metu yra neįmanomas, nes jo fizikinės savybės yra itin panašios į tikslinio baltymo.

7. SANTRUMPA

UAB Sicor Biotech buvo įmonėje buvo susidurta su problema, kuomet pasikeitus mielių ekstrakto partijai, smarkiai krito E.coli K802/pT7a-GCSF fermentacijos proceso parametrai. Taip pat šis pasikeitimas sąlygojo padidėjusį tikslinio baltymo priemaišos kiekį, kurios taikoma gryninimo technologija nesugeba pašalinti.

Tyrimo metu buvo nustatyta, kad fermentacijos proceso parametru redukciją ir RRT 1,10 priemaišos kiekio padidėjimą lėmė sumažėjęs geležies kiekis mielių ekstrakto. Šį proceso parametru sumažėjimą galima atstatyti į auginimo terpę pridėjus geležies arba mangano jonų. Taip pat terpės praturtinimas šiais elementais sumažina RRT 1,10 kiekį galutiniame produkte, tačiau generuoja papildomas priemaišas – mažesnės molekulinės masės tikslinio baltymo formas. Eksperimentu metu buvo nustatyta reikiama geležies koncentracija mielių ekstrakto ($49 \pm 5 \mu\text{g/g}$), kuri atstato fermentacijos proceso parametrus į reikiamą lygį, sumažina RRT 1,10 priemaišos kiekį iki leidžiamo, tačiau negeneruoja papildomų priemaišų.

Be to, šio tyrimo metu, buvo charakterizuota tikslinio baltymo priemaiša RRT 1,10. Ši priemaiša susideda iš dviejų komponentų: deamidintų tikslinio baltymo formų ir tikslinio baltymo mutanto (W119→F119). Priemaišos padidėjimą galutiniame produkte lėmė išaugęs W119→F119 mutanto kiekio padidėjimas, kuris buvo sąlygotas sumažėjusio geležies kiekio auginimo terpėje.

8. SUMMARY

Few years ago, Sicor Biotech UAB had faced an issue – decrease of E.coli K802/pT7a-GCSF fermentation process parameters and increase of impurity of RRT 1.10 in the final product. These problems appeared after changed lot of yeast extract.

In this study, we found out, that these decrease of fermentation parameters and increase of impurity level were caused by the lower iron level than usually in one of culture media components – yeast extract. These issues can be eliminated by adding iron and manganese ions to the culture media. This also reduces level of RRT 1.10, but additional impurities of lower molecular mass forms of target protein appear. After series of experiments required concentration of iron ions in yeast extract was determined. $49 \pm 5 \mu\text{g/g}$ is an optimal iron concentration in yeast extract. This concentration keeps fermentation parameters at optimal level, reduces level of RRT 1.10 and also does not induce production of smaller molecular mass target protein forms.

Moreover, in this study, characterization of RRT 1.10 was performed. This impurity consists of two components: deamidated forms of target protein and mutant of target protein (W119→F119). Increased level of RRT 1.10 was caused by higher amount of mutant, which was generated during starve of iron.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

Knygos:

Crueger W, Crueger A. Substrates for Industrial Fermentation. In *Biotechnology, a Textbook of Industrial Microbiology*. 1980; Sunderland, MA: p 59 – 63.

Earhart CF. Cellular and Molecular Biology, 2nd edition. Uptake and Metabolism of Iron and Molybdenum in: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington DC: ASM Press; 1996. p 1075 – 1090.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Brock Biology of Microorganisms. 14th ed. Boston: Pearson; 2014. 486 p.

Michal G, Schomburg D. Biochemical Pathways: an Atlas of Biochemistry and Molecular Biology. 2nd edition. New Jersey: John Wiley & Sons; 2012. p 73 – 75.

Rathore AS, Mhatre R. Quality by Design for Biopharmaceuticals. Principles and Case Studies. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009. p 89 – 103.

Winkelmann G. (Ed.) Microbial Transport Systems. Weinheim: Wiley-VCH; 2001. p 289 – 311.

Zimbro MJ, Power DA. Difo™ & BBL™ Manual. Manual of Microbiological Culture Media. Maryland: Beckton. Dickenson and Company; 2003: p 7 – 12.

Patentai:

Bumelis VA, Janenienė L, Pesliakas H, Rimkevičienė J, Vaitkevičius A, Žunda G, Žvirblis G. Method for Purifying Granulocyte-Colony Stimulating Factor. US Patent 2007/0293660 A1. December 2007.

Wich G, Dassler T. Process for the Fermentative Production of Antibodies. US Patent 2008/0206818 A1. September 2007.

Straipsniai:

Ališauskaitė S, Bumelis VA, Belokon A. Optimization of Cloning and Expression of 6His-tagged 196 aa Length Oncostatin M in *E.coli*. *Biologija*. 2012; 58(2): 61 – 69.

Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. Bacterial Iron Homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003; 27: 215 – 237.

Anjem A, Imlay JA. Mononuclear Iron Enzymes Are Primary Targets of Hydrogen Peroxide Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(19): 15544 – 15556.

Anjem A, Varghese S, Imlay JA. Manganese Import Is a Key Element of the OxyR Response to Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 2009; 72(4): 844 – 858.

Barnese K, Gralla EB, Valentine JS, Cabelli DE. Biologically Relevant Mechanism for Catalytic Superoxide Removal by Simple Manganese Compounds. *PNAS*. 2012; 109(18): 6892 – 6897.

Beinert H, Holm RH, Munck E. Iron – Sulfur clusters: Nature’s Modular, Multipurpose Structures. *Science*. 1997; 277: 653 – 659.

Benov LT, Fridovich I. *Escherichia coli* Expresses a Copper- and Zinc-containing Superoxide Dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(41): 25310 – 25314.

Bernd L. Cytochrome c Oxidase in Prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 1987; 3(1): 41 – 56.

Blattner FR, Plunket III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 1997; 277: 1453 – 1462.

Bönig H, Silbermann S, Weller S, Kirsche R, Körholz D, Janssen G, Göbel U, Nürnberger W. Glycosylated vs Non-Glycosylated Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) – Results of a Prospective Randomised Monocentre Study. *Bone Marrow Transplantation*. 2001; 28: 259 – 264.

Carpenter BM, Whitmire JM, Merrell DS. This Is Not Your Mother’s Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2009; 77(7): 2590 - 2601.

Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo – Transport of Ferrous Iron Into Bacteria. *BioMetals*. 2006; 19: 143 – 157.

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Hellington RB. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1973; 70; 11: 3240 – 3244.

Cooper RA, Knowles PF, Brown DE, McGuirl MA, Dooley DM. Evidence for Copper and 3,4,6-trihydroxyphenylalanine Quinone Cofactor in an Amine Oxidase from the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* K-12. *Biochemical Journal*. 1992; 288: 337 – 340.

Cornelis P, Wei Q, Andrews SC, Vinckx T. Iron Homeostasis and Management of Oxidative Stress Response in Bacteria. *Metallomics*. 2011: 1 – 10.

Crater JS, Lievense JC. Scale-up of Industrial Microbial Processes. *FEMS Microbiology Letters*. 2018; 365(13): <https://doi.org/10.1093/femsle/fny138>.

Dubrac S, Touati D. Fur Positive Regulation of Iron Superoxide Dismutase in *Escherichia coli*: Functional Analysis of the *sodB* Promoter. *Journal of Bacteriology*. 2000; 182(13): 3802 – 3808.

Flemming D, Schlitt A, Spehr V, Bischof T, Friedrich T. Iron-Sulfur Cluster N2 of the Escherichia coli NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Is Located on Subunit NuoB. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(48): 47602 – 47609.

Grant CL, Pramer D. Minor Element Composition of Yeast Extract. *Journal Bacteriology*. 1962; 84: 869 – 870.

Grunenwald CM, Choby JE, Juttukonda LJ, Beavers WN, Weiss A, Torres VJ, Skaar EP. Manganese Detoxification by MntE Is Critical for Resistance to Oxidative Stress and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *American Society for Microbiology*. 2019; 10.1128/mBio.02915-18.

Gunsalus RP, Yanofsky C. Nucleotide Sequence and Expression of *Escherichia coli* *trpR*, the Structural Gene for the *trp* aporepressor. *Biochemistry*. 1980; 77(12): 7117 – 7121.

Hollingshead LM, Goa KL. Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rG-CSF) a Review of Its Pharmacological Properties and Prospective Role in Neutropenic Conditions. *Drugs*. 1991; 42(2): 300 – 330.

Idalia VMN, Bernardo F. *Escherichia coli* as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. *IntechOpen*. 2017; 13: 253 – 274.

Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME. SitABCD Is the Alkaline Mn²⁺ Transporter of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. 2002; 184(12): 3159 – 3166.

Koppenol WH. The Haber-Weiss Cycle – 70 Years Later. *Redox Report*. 2001; 6(4): 229 – 234.

Lah SM, Dixon MM, Pattridge KA, Stallings WC, Fee JA, Ludwig ML. Structure-Function in Escherichia coli Iron Superoxide Dismutase: Comparison with the Manganese Enzyme from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*. 1995; 34: 1646 – 1660.

Liu J, Chakraborty S, Hosseinzadeh P, Yu Y, Tian S, Petrik I, Bhagi A, Lu Y. Metallalloproteins Containing Cytochrome, Iron-Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chemical Reviews*. 2014; 114: 4366 – 4469.

Mandal AK, Cheung WD, Argueullo JM. Characterization of a Thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the Extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. 2002; 277(9): 7201 – 7208.

McHugh J, Quinones FR, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC. Global Iron-Dependent Gene Regulation in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(32): 29478 – 29486.

Mickienė G, Dalgedienė I, Dapkūnas Ž, Žvirblis G, Pesliakas H, Kaupinis A, Valius M, Mistinienė E, Pleckaitytė M. Construction, Purification and Characterization of a Homodimeric Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Molecular Biology*. 2017.

Molineux G. The Design and Development of Pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta®). *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10: 1235 – 1244.

Nagata S, Tsuchiya SA, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, Hirata Y, Kubota N, Oheda M, Nomura H, Ono M. Molecular Cloning and Expression of cDNA for Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Nature*. 1986; 319(30): 415 – 418.

Nicola NA, Matcalf D, Johnson GR, Burgess AW. Separation of Functionally Distinct Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. *Blood*. 1979; 54(3): 614 – 627.

Patzer SI, Hantke K. Dual Repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the *mntH* Gene, Encoding an NRAMP-Like Mn²⁺ Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2001; 183(16): 4806 – 4813.

Puig S, Ramos-Alonso L, Romero AM, Martinez-Pastor MT. The Elemental Role of Iron in DNA Synthesis and Repair. *Metallomics*. 2017; 9(11): 1483 – 1500.

Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. *Journal of Bacteriology*. 1999; 181(19): 5891 – 5897.

Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* Mechanisms of Copper Homeostasis in a Changing Environment. *FEMS Microbiology Reviews*. 2003; 27: 197 – 213.

Seo SW, Kim D, Latif H, O'Brien EJ, Szubin R, Palsson BO. Deciphering Fur Transcriptional Regulatory Network Highlights Its Complex Role Beyond Iron Metabolism in *Escherichia coli*. *Nature Communications*. 2014; 5: 4910.

Sobota JM, Imlay JA. Iron Enzyme Ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* Is Rapidly Damaged by Hydrogen Peroxide but Can Be Protected by Manganese. *PNAS*. 2011; 108(13): 5402 – 5407.

Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, Barendt J, Platzer E, Moore MAS, Mertelsmann R, Welte K. Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Effects on Normal and Leukemic Myeloid Cells. *Science*. 1986; 232(4746): 61 – 65.

Steffens GCM, Biewald R, Buse G. Cytochrome c Oxidase Is a Three-copper, two-heme-A Protein. *European Journal of Biochemistry*. 1987; 164: 295 – 300.

Tanaka M, Chock PB, Stadtman ER. Oxidized messenger RNA induces translation errors. *PNAS*. 2007; 104(1): 66 – 71.

Tatum EL, Lederberg J. Gene Recombination in Bacteria *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1947; 53(6): 673 – 684.

Touati D. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000; 373(1): 1 – 6.

Widdel F. Theory and Measurement of Bacterial Growth. Grundpraktikum Mikrobiologie. 2010; 4: 1 – 11.

Wong WKR, Ka-Lun N, Sivakumar T, Hu XH, Wang H, Nelson Lai LC. *Escherichia coli*: A Versatile Platform for Recombinant Protein Expression. IntechOpen. 2018; 1 – 23.

Wood WB. Host Specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial Mutations affecting the Restriction and Modification of DNA. Journal of Molecular Biology. 1966; 16: 118 – 133.

Wright CR, Ward AC, Russell AP. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Potential Application for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. Mediators of Inflammation. 2017; ID 7517350.

Yang J, Moyana T, MacKenzie S, Xia Q, Xiang J. One Hundred Seventy – Fold Increase in Excretion of an FV Fragment – Tumor Necrosis Factor Alpha Fusion Protein (sFV/TNF- α) from *Escherichia coli* Caused by the Synergistic Effects of Glycine and Triton X-100. Applied and Environmental Microbiology. 1998; 64(8): 2869 – 2871.

Zeinert R, Martinez E, Schmitz J, Senn K, Usman B, Anantharaman V, Aravind L, Waters LS. Structure-function Analysis of Manganese Exporter Proteins Across Bacteria. Journal of Biological Chemistry. 2018; doi: 10.1074/jbc.M117.790717.

Zhang J, Reddy J, Buckland B, Greasham R. Toward Consistent and Productive Complex Media for Industrial Fermentations: Studies on Yeast Extract for a Recombinant Yeast Fermentation Process. Biotechnology and Bioengineering. 2003; 82(6): 640 – 652.

Zhang N. Photoelectron Spectroscopy of Manganese-sulfur Cluster Anions. The Journal of Chemical Physics. 1995; 104(1): 36 – 41.

Interneto svetainės:

Microsoft. LINEST (funkcija LINEST). Žiūrėta 2019 05 26.
<https://support.office.com/lt-lt/article/linest-funkcija-linest-84d7d0d9-6e50-4101-977a-fa7abf772b6d>