



# La produzione di anticorpi ricombinanti nel batterio antartico *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC<sub>125</sub>

MARIA GIULIANI, ERMENEGILDA PARRILLI, FILOMENA SANNINO,  
GENNARO ANTONIO APUZZO, MARIA LUISA TUTINO, GENNARO MARINO

## 1. Abstract

The monoclonal antibody market represents the fastest-growing segment within the biopharmaceutical industry. Indeed, recombinant antibodies and antibody fragments are widespread tools for research, diagnostics and therapy. Large-scale production of recombinant antibodies and antibody fragments requires a suitable expression system which has to be cheap, accessible for genetic modifications, easily scaled up. Although prokaryotic expression systems can reduce production costs, recombinant antibody production in conventional bacterial hosts, such as *Escherichia coli*, often results in inclusion bodies formation. Since lowering of the expression temperature can increase product solubility facilitating its correct folding, a novel process for recombinant antibody fragments production at low temperatures was established by using the Antarctic Gram-negative bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC<sub>125</sub> as recombinant expression host. To test the versatility of the newly developed process, the production of three aggregation prone model proteins, corresponding to the most common formats of antibody fragments: Fab, scFv and VHH, was evaluated. The construction of an *ad hoc* genetic expression system for each model protein followed a rational design where several critical aspects were considered including the selection of molecular signals for targeting the proteins to the periplasmic space and the choice of optimal gene-expression strategies. For Fab fragment production

in heterodimeric form an artificial operon was designed and constructed. Moreover, a new defined minimal medium was made-up to maximize bacterial growth parameters and recombinant production yields. All model proteins were obtained in soluble and biologically competent form.

The observed proficiency of the Antarctic bacterium to produce recombinant antibody fragments was related to the unusually high number of genes encoding peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases found in the *P. haloplanktis* TAC<sub>125</sub> genome, making this bacterium the host of choice for the recombinant production of this protein class.

*Parole chiave:* frammenti anticorpali, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC<sub>125</sub>, peptidil-prolil isomerasi, produzione di proteine ricombinanti, sistemi di espressione a freddo.

## 2. Introduzione

Nel panorama delle moderne biotecnologie, la produzione di proteine ricombinanti rappresenta certamente uno dei campi di maggior interesse economico. La disponibilità di numerose piattaforme cellulari per la produzione di proteine ricombinanti, ciascuna delle quali caratterizzata da proprietà peculiari, aumenta la probabilità di ottenere il prodotto ricombinante di interesse in forma solubile e biologicamente attiva, abbattendone contemporaneamente i costi di produzione. Tuttavia, la produzione di proteine ricombinanti continua ad essere un'attività molto artigianale, dal momento che non è ancora possibile prevedere *a priori* il buon esito del processo, se cioè la proteina di interesse risulterà correttamente prodotta nel sistema d'espressione scelto.

Uno dei problemi più spesso incontrati durante la produzione di una proteina ricombinante è il suo ottenimento sotto forma di aggregati insolubili, che nei procarioti assumono la definizione di "corpi inclusi". Lo studio dei processi che sono alla base dell'aggregazione proteica ha dimostrato che il fenomeno è prevalentemente dovuto alle interazioni stereospecifiche tra il solvente acquoso e le superfici idrofobiche del polipeptide neosintetizzato [43, 5]. Questo effetto, definito effetto idrofobico, è un processo sostanzialmente endotermico,

per cui risulta minimizzato in seguito all'abbassamento della temperatura del processo. Pertanto, la produzione di proteine ricombinanti in batteri psicrofili, cioè in batteri naturalmente adattati a crescere alla temperatura di 4 °C o inferiore, può rappresentare un'interessante alternativa per incrementare la qualità e la solubilità dei prodotti proteici. Una tale piattaforma cellulare potrebbe consentire l'ottenimento, in forma biologicamente attiva, di tutti quei prodotti proteici che si presentano come corpi inclusi in altri ospiti. Negli ultimi anni alcuni batteri adattati al freddo hanno attratto l'attenzione dei ricercatori in quanto dotati di interessanti proprietà che ne fanno delle potenziali fabbriche cellulari per la produzione di proteine ricombinanti. In particolare, il batterio Gram-negativo *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, isolato dall'acqua di mare dell'Antartide [3], si è rivelato di estremo interesse in quanto non solo è uno dei batteri psicrofili in grado di replicarsi più rapidamente in un intervallo ampio di temperature (0–30 °C) [45], e di raggiungere elevate densità cellulari anche a 0 °C (fino a  $A_{600}=20$ ) in condizioni ottimali di nutrizione ed aereazione.

Poiché è risultato così ben adattato alla vita a basse temperature, *P. haloplanktis* TAC125 è stato il primo batterio antartico di cui è stata completamente determinata ed annotata la sequenza genomica [29]. Lo studio del genoma e l'analisi del comportamento *in vivo* del batterio hanno consentito di mettere in evidenza alcune caratteristiche genomiche e metaboliche, che ne giustificano le eccezionali proprietà di crescita precedentemente descritte.

Tra tutte le strategie cellulari relative alla capacità del batterio di adattarsi a condizioni di vita così estreme, è utile ricordare che i) il batterio si difende dagli effetti deleteri dall'aumento della concentrazione delle specie reattive dell'ossigeno (una conseguenza delle basse temperature) non solo attivando i classici enzimi che proteggono dallo stress ossidativo (quali la superossido dismutasi SodB, la tioredossina riduttasi TrxB, o la catalasi) [50], ma anche tramite una nuova strategia che utilizza un'emoglobina batterica [37]; ii) il genoma batterico è caratterizzato da un numero inusualmente elevato di geni che codificano rRNA e tRNA (questi ultimi ammontano a 106 geni, alcune volte organizzati in lunghe ripetizioni) circostanza questa che può giustificare l'impressionante capacità di traduzione a basse temperature. Infine, recentemente sono stati messi a punto degli schemi di ingegneria genetica che hanno consentito la costruzione di mutanti genomici

sito specifici (mutanti di inserzione o di delezione). Questi hanno permesso la creazione di ceppi batterici modificati geneticamente e che mostrano migliori caratteristiche nella produzione di proteine ricombinanti [35, 37].

Un altro motivo che ha giustificato il crescente interesse scientifico nei confronti di *P. haloplanktis* TAC<sub>125</sub> è stato la messa a punto di una efficiente tecnologia per l'espressione genica ricombinante in questo microrganismo inserendo, all'interno di un vettore di clonaggio di *E. coli* opportunamente modificato [46], specifici segnali molecolari psicrofili [45, 11]. Diverse generazioni di vettori di espressione psicrofili hanno consentito di ottenere proteine ricombinanti attraverso modalità costitutive [11] o inducibili [34], e di indirizzare i prodotti ricombinanti verso uno dei compartimenti cellulari e/o di secernerli nel mezzo extracellulare [36]. I vantaggi derivanti dalla secrezione di una proteina ricombinante consistono in uno schema di purificazione generalmente più semplificato ed economico. Inoltre, la traslocazione extra-citoplasmatica rappresenta un'ottima strategia per fornire al prodotto ricombinante un residuo N-terminale autentico, dal momento che la traslocazione comporta generalmente la rimozione della sequenza segnale [30]. Tale processo consente di rimuovere il residuo iniziale di metionina la cui presenza, oltre a poter evocare una reazione immunogenica nel caso in cui la proteina sia somministrata come agente terapeutico, può ridurre l'attività biologica e la stabilità del prodotto stesso [28].

Numerosi sono gli esempi in cui l'utilizzo della piattaforma di produzione di proteine ricombinanti nel batterio psicrofilo si è dimostrato risolutivo delle problematiche riscontrate durante la produzione delle medesime proteine in *E. coli*. Molto indicativi sono due esempi di produzione di proteine ricombinanti "difficili": il fattore neurotrofico umano NGF, h-NGF, [47] e la  $\alpha$ -glucosidasi da *Saccharomyces cerevisiae* [34].

La produzione della forma matura di h-NGF presenta numerose difficoltà al microrganismo produttore: la corretta strutturazione della proteina (il processo detto di *folding*) richiede infatti la formazione di tre ponti disolfurici non consecutivi (che assumono un'organizzazione strutturale definita nodo a cisteina o *cysteine-knot fold*) e la formazione di un omodimero. I numerosi tentativi di produrre questa proteina in *E. coli* sono risultati fallimentari, determinando immancabilmente un

suo accumulo in forma insolubile [40]. Al contrario la produzione della proteina matura h-NGF in *P. haloplanktis* TAC125 ha dato luogo ad un prodotto totalmente solubile correttamente traslocato nel periplasma, dove si accumula in forma completamente dimerica [47]. Anche l'enzima  $\alpha$ -glucosidasi da *S. cerevisiae* [34], prototipo delle proteine eucariotiche di solito espresse in forma prevalentemente insolubile, quando prodotto in *P. haloplanktis* TAC125 è risultato completamente solubile e attivo [34].

L'osservazione che in *P. haloplanktis* TAC125 non siano mai stati osservati aggregati insolubili di proteina ricombinante suggerisce che le condizioni chimico-fisiche nelle cellule di questo batterio e/o i processi di *fold*ing sono abbastanza differenti da quanto osservato nei batteri mesofili. Sembra dar credito a questa ipotesi un lavoro recente [39] che riporta la valutazione, mediante l'impiego di un approccio di proteomica differenziale, del profilo di espressione degli *chaperone* molecolari di *P. haloplanktis* TAC125 alla temperatura di crescita ottimale (0–4 °C). In queste condizioni ambientali, il batterio produce un eccesso di uno *chaperone* associato al ribosoma, il *trigger factor*, mentre la produzione dei principali *chaperones* di risposta agli *shock* termici — DnaK, GroEL, sHSP, Hsp90, e Dsb — è ridotta ad un livello pressoché non rivelabile. Se si considera che la classica funzione attribuita a questi *chaperones* molecolari è di assistere co- o post-traduzionalmente il *fold*ing proteico e di prevenire o recuperare il *misfold*ing, si può ragionevolmente affermare che la corretta strutturazione di polipeptidi nascenti si basa essenzialmente sulla azione del *trigger factor*. Questo *chaperone*, dotato anche di una attività *cis-trans* isomerasica dei legami peptidil-prolinici [39], interagisce praticamente con tutti i polipeptidi nascenti, potendo essere considerato a buon diritto il principale fattore di strutturazione proteica durante la crescita di *P. haloplanktis* TAC125.

È interessante osservare che l'attività delle peptidil prolil *cis-trans* isomerasi (PPIasi) è essenziale nel *fold*ing delle molecole anticorpali [12]. In effetti, lo studio dei percorsi di strutturazione degli anticorpi ha dimostrato che successivamente alla formazione dei legami disolfurici intra-catena nel dominio variabile e costante [48], la isomerizzazione *cis-trans* di un legame peptidil prolinico dirige la strutturazione della proteina verso la conformazione nativa, consentendo la successiva formazione di ponti disolfurici inter-catena. È stato inoltre dimostrato che l'attività delle PPIasi è particolarmente importante nella

prevenzione dell'aggregazione di frammenti anticorpali durante la loro produzione ricombinante [12].

Questa osservazione ci ha spinto ad esplorare la produzione di diversi frammenti anticorpali in *P. haloplanktis* TAC125. In questa rassegna verranno riassunti i risultati ottenuti circa la produzione in forma solubile e biologicamente attiva di frammenti anticorpali di interesse farmaceutico che, in altri sistemi di produzione batterica, tendono ad accumularsi sotto forma di aggregati proteici, in particolare:

- il frammento anticorpale a singola catena scFv anti-ossazolone [18];
- l'anticorpo da camelide VHHD6.1 [19];
- il frammento anticorpale 3H6 Fab [9, 17].

Nel panorama dei bio-farmaci, studi recenti hanno messo in evidenza il crescente significato economico del mercato degli anticorpi ricombinanti. Il mercato globale di anticorpi monoclonali risulta in costante crescita, con una tendenza che si prevede stabile nei prossimi anni [4]. Accanto alla produzione di anticorpi monoclonali, lo sviluppo delle applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante ha consentito la progettazione di formati più piccoli di tali proteine, definiti frammenti anticorpali. Tali frammenti, pur mantenendo la specificità di legame dell'anticorpo monoclonale intero, hanno la caratteristica di possedere proprietà uniche e migliorate in un ampio spettro di applicazioni diagnostiche e terapeutiche. Infatti, in alcune applicazioni cliniche, frammenti anticorpali piccoli presentano numerosi vantaggi rispetto all'anticorpo intero. Innanzitutto, l'assenza della regione costante Fc riduce il rischio di risposta immune. Inoltre le piccole dimensioni permettono a queste molecole di penetrare nei tessuti e nei tumori solidi molto più rapidamente dell'anticorpo intero [52]. Inoltre, è possibile prevedere numerose applicazioni di questi frammenti anticorpali al di fuori dell'ambito della ricerca e della medicina, come per esempio l'uso in biosensori [21] e processi di separazione fatti su scala industriale, come la separazione di molecole chirali [20].

Affinché queste proteine di rilevante interesse economico possano trovare applicazione nei processi di cui abbiamo fatto precedentemente menzione, è necessario sviluppare degli opportuni sistemi per la

loro produzione ricombinante su larga scala. È essenziale che tali sistemi risultino economici, accessibili alla modifica genetica, facilmente dimensionabili per soddisfare la crescente richiesta ed infine sicuri per i consumatori finali. Malgrado siano stati valutati per la loro capacità di produrre anticorpi liberi e ricombinanti con diversa efficienza numerosi sistemi batterici, sia Gram-positivi che Gram-negativi, la maggior parte dei tentativi si è concentrata su *E. coli*, per una serie di ragioni di natura sia storica sia pratica [14, 1]. Tuttavia, le numerose difficoltà connesse alla qualità ed alla solubilità di frammenti anticorpali prodotti in maniera ricombinante nel batterio mesofilo rendono necessaria l'esplorazione di altre piattaforme cellulari per la produzione su larga scala di queste proteine. Di qui l'interesse a valutare la produzione di diversi frammenti anticorpali nel batterio antartico *P. haloplanktis* TAC125, al fine di valutarne le eventuali superiori capacità nella produzione ricombinante di queste molecole interessanti.

### **3. Il sistema di espressione genica psicofilo per la produzione ricombinante di frammenti anticorpali in *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125**

Dal momento che la corretta strutturazione di anticorpi e frammenti anticorpali richiede la formazione di ponti disolfurici, il lavoro si è inizialmente concentrato sulla scelta di un opportuno segnale molecolare (peptide segnale) da utilizzare per l'indirizzamento del prodotto ricombinante verso lo spazio periplasmatico, il distretto cellulare in cui questa modifica post-traduzionale si realizza nei batteri Gram-negativi. Due sono le principali strade che dirigono una proteina non strutturata al sistema di traslocazione Sec della membrana interna nei batteri Gram-negativi, e le caratteristiche dei due segnali (sequenza e distribuzione di specifici aminoacidi) definisce quale delle due strade sarà seguita da una determinata preproteina.

Il sistema più frequentemente utilizzato è la traslocazione SecB-dipendente [49], in cui il polipeptide è traslocato nello spazio periplasmatico post-traduzionalmente, cioè dopo la sua sintesi completa [8]. Per consentire il riconoscimento della proteina da parte del complesso SecYEG, è essenziale lo stato non strutturato della proteina, per cui possono esserci problemi di traslocazione laddove la cinetica di *fold*ing

risulti essere più rapida dell'evento di riconoscimento da parte del sistema di esportazione. Infatti, se la proteina acquisisce una qualsiasi struttura tridimensionale, essa diviene un substrato non più adeguato per il macchinario di traslocazione e viene quindi confinata nel citoplasma, dove spesso subisce degradazione proteolitica [6]. L'analisi del genoma di *P. haloplanktis* TAC125 ha messo in evidenza che esso contiene un sistema classico di traslocazione SecB-dipendente [29].

D'altro canto, i batteri posseggono un equivalente del sistema eucariotico di riconoscimento del segnale (SRP), il quale è in grado di traslocare la preproteina attraverso un meccanismo co-traduzionale. Il sistema batterico SRP riconosce specifiche regioni idrofobiche, presenti nella sequenza del peptide segnale della proteina nascente durante la sua sintesi, e di conseguenza la sua traduzione e traslocazione risultano essere simultanee. In *E. coli*, il sistema SRP [41] è costituito dalla proteina Ffh, che interagisce con un piccolo RNA 4.5 S, mentre il suo recettore nella membrana interna è la proteina integrale di membrana FtsY [22]. Il genoma di *P. haloplanktis* TAC125 è stato analizzato alla ricerca di geni codificanti proteine omologhe a Ffh e FtsY. Tale analisi ha consentito di identificare due geni (PSHAa0942 e PSHAa0354) codificanti le proteine del sistema di traslocazione SRP-dipendente presente nel batterio psicrofilo.

Al fine di definire quale delle due vie di traslocazione risulta essere la più efficace per la produzione di frammenti anticorpali in *P. haloplanktis* TAC125, sono state prodotte due varianti della proteina scFvOx, ciascuna caratterizzata da un differente peptide segnale. Una preproteina conteneva un peptide segnale SecB-dipendente (il peptide segnale PsA della  $\alpha$ -amilasi psicrofila del batterio *P. haloplanktis* TAB23), l'altra una sequenza segnale SRP-dipendente (PsD della proteina DsbA del batterio *P. haloplanktis* TAC125). È interessante notare che, nel più comune ospite di produzione *E. coli*, in base ai dati riportati da Thie et al. [44] entrambe le vie di traslocazione sono efficaci nella produzione di scFv. I dati da noi ottenuti dimostrano al contrario che solo il segnale di traslocazione co-traduzionale consente la corretta produzione del frammento anticorpale, la sua traslocazione periplasmatica e l'accumulo in forma totalmente solubile ed attiva [18]. La totale assenza di proteina nella frazione citoplasmatica indica inoltre un perfetto riconoscimento ed una efficiente traslocazione della proteina ricombinante. Alla luce di questi dati è stato selezionato



per la produzione di altri frammenti anticorpali nel batterio psicrofilo il peptide segnale PsD.

Effettuata la scelta dell'opportuno segnale di indirizzamento periplasmatico, si è passati alla scelta dello specifico sistema di espressione ricombinante psicrofilo da utilizzare in tutti gli esperimenti di produzione in *P. haloplanktis* TAC125. Il vettore d'espressione scelto è pUCRP [34] in quanto caratterizzato dalla presenza di un promotore psicrofilo regolato la cui trascrizione è indotta dalla presenza di L-malato nel mezzo di coltura. Inoltre tale promotore mostra la più elevata efficienza trascrizionale in terreno minimo tra tutti i promotori psicrofili al momento disponibili. Per quanto riguarda la costruzione del vettore di espressione per scFvOx, il gene *psD-scFvOx-c-myc* è stato clonato *in frame* con una sequenza codificante una coda di 6 residui di istidine.

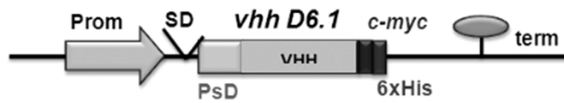
Il sistema di espressione appena descritto ha permesso di ottenere una proteina ricombinante di fusione che, accanto al peptide leader N-terminale necessario per la secrezione periplasmatica PsD, presenta due *tag* di fusione consecutivi al C-terminale, il c-Myc utile per la sua rivelazione e la coda di sei istidine per la purificazione del prodotto ricombinante (Fig. 1a).

Il medesimo vettore d'espressione modificato è stato usato anche per la produzione del VHH D6.1 (Fig. 1b), sostituendo il gene codificante scFvOx con il gene *vhhD6.1* opportunamente amplificato mediante PCR.

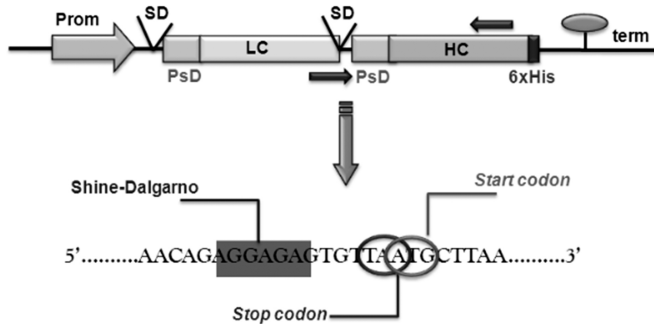
Per quanto riguarda la produzione del Fab 3H6, particolare attenzione è stata dedicata alla costruzione di un operone sintetico (Fig. 1c) in cui i due geni codificanti la catena leggera e quella pesante del Fab 3H6 fossero collocati opportunamente nello spazio. Per ottenere una proteina funzionale è infatti necessario il corretto assemblaggio di una catena leggera con una catena pesante in rapporto stechiometrico 1:1. Negli operoni procariotici la traduzione bilanciata di geni co-trascritti è ottenuta mediante il cosiddetto *coupling* traduzionale, per il quale è necessaria la completa traduzione del gene precedente per l'efficiente traduzione del gene distale. Geni accoppiati traduzionalmente sono caratterizzati da una particolare struttura della loro giunzione intercistronica, che venne identificata per la prima volta nell'operone del triptofano di *E. coli* [33]. È stata condotta un'analisi *in silico* dell'organizzazione strutturale di operoni naturalmente accoppiati in *cluster* nel genoma di *P. haloplanktis* TAC125. La maggior parte degli operoni ana-



a



b



c

**Figura 1.** Schema delle cassette di espressione utilizzate per la produzione ricombinante dei frammenti anticorpali nel batterio *P. haloplanktis* TAC125. Pannello a: Cassetta di espressione per la produzione del ScFvOx; Pannello b: Cassetta di espressione per la produzione del VHH D6.1; Pannello c: Cassetta di espressione per la produzione del Fab3H6; Prom: promotore inducibile da L-malato; term: terminatore del gene *aat* di *P. haloplanktis* TAC125; SD: sequenza Shine-Dalgarno; PsD: sequenza codificante il peptide segnale del gene *dsbA* di *P. haloplanktis* TAC125; C-myc: sequenza codificante un tag utilizzato per immunorivelazione; 6XHis: sequenza codificante sei residui di istidina, utilizzata per la purificazione della proteina ricombinante.

lizzati ha mostrato la stessa organizzazione strutturale, in cui il codone di inizio del secondo gene del *cluster* si sovrappone al codone di stop del gene precedente, condividendo una coppia di basi. Come mostrato nella Fig. 1c, questa struttura è stata riproposta nella costruzione dell'operone artificiale per la produzione del frammento Fab 3H6. Inoltre, poiché per un'efficiente espressione del gene distale è necessario un sito di legame al ribosoma, un'identica sequenza Shine–Dalgarno è collocata sia a monte del gene *lc* sia a monte del gene *hc*.

#### 4. Ottimizzazione del terreno di coltura per la produzione ricombinante di proteine in *P. haloplanktis* TAC125

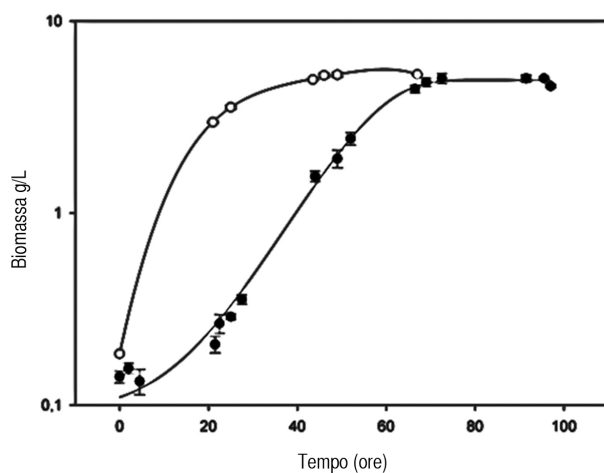
La comprensione della fisiologia cellulare e l'ottimizzazione delle strategie di coltivazione sono fattori essenziali per raggiungere l'obiettivo di un'elevata produzione di proteine ricombinanti da parte di organismi. Infatti, quando il prodotto è associato alle cellule, la produttività è correlata al livello di biomassa ottenuta durante il processo. In questo caso, l'ottimizzazione della produzione della proteina è strettamente dipendente dalla composizione del mezzo di coltura e, di conseguenza, strettamente associato alla scelta della più opportuna strategia di coltivazione da usare. Un'efficiente produzione in forma completamente solubile e cataliticamente competente di numerose proteine termolabili o tendenti alla aggregazione è stata ottenuta spesso in terreni di coltura definiti, dove i livelli di induzione e le rese di produzione sono risultati ottimizzati anche se confrontati con quelli ottenibili usando comuni mezzi di coltura ricchi e complessi [34].

Al fine di incrementare le rese di produzione delle proteine ricombinanti di interesse industriale da parte del sistema d'espressione psicrofilo, sono stati valutati: l'effetto della composizione del mezzo di coltura, la concentrazione di biomassa finale e la velocità di crescita e di produzione di proteina [17].

Inoltre è stata valutata la produzione di proteine ricombinanti di *P. haloplanktis* TAC125 in un nuovo terreno di coltura sintetico ottimizzato per tale scopo.

In diversi lavori è stato riportato che il batterio psicrofilo di nostro interesse mostra una preferenza nutrizionale per gli amminoacidi come fonte di carbonio ed azoto. Per questo motivo i parametri di crescita

del batterio sono stati determinati in mezzi sintetici costituiti da una base minerale (Sali SCHATZ) con l'aggiunta di diversi aminoacidi [17]. I risultati ottenuti hanno suggerito di utilizzare L-leucina, in combinazione con L-isoleucina ed L-valina, come fonti di carbonio e d'azoto, ed hanno condotto alla formulazione del terreno LIV, il quale è stato poi impiegato in tutti i successivi tentativi di produzione di proteina ricombinante sia in coltivazione *batch* o in chemostato. In particolare il terreno LIV contiene i tre aminoacidi L-leucina, L-isoleucina ed L-valina nel rapporto molare 1:1:2. Come mostrato nella Fig. 2, la crescita del microrganismo psicrofilo in terreno LIV è caratterizzata da una fase di latenza molto breve, e da un modesto, ma significativo incremento della velocità specifica di crescita e della resa in biomassa rispetto alla crescita in terreno contenente solo L-leucina [17].



Fonte di carbonio	$\mu_{max}$	Resa in biomassa ( $g_{dew} L^{-1}$ )
L-leucina	$0.10 \pm 0.01$	$3.70 \pm 0.30$
LIV	$0.13 \pm 0.01$	$5.65 \pm 0.25$

**Figura 2.** Confronto delle curve di crescita del batterio *P. haloplanktis* TAC125 in terreni sintetici definiti SCHATZ contenenti L-leucina (cerchio pieno) e una miscela di L-leucina, L-isoleucina e L-valina in rapporto molare 1:1:2 (cerchio aperto).

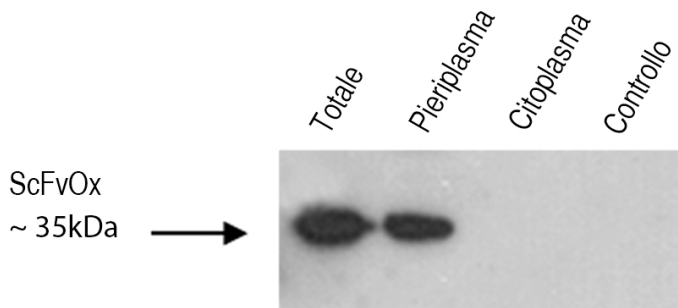
## 5. Produzione del frammento anticorpale a singola catena scFv anti-ossazolone

ScFv (*Single chain variable Fragment* o frammento anticorpale a singola catena variabile) è il principale frammento (30 kDa) che continua a mantenere l'unità attiva di legame all'antigene delle immunoglobuline. Le applicazioni cliniche di queste molecole richiedono la disponibilità di notevoli quantità di ScFv funzionali ed a basso costo. Tuttavia, la produzione ricombinante di questa famiglia di proteine nell'ospite batterico convenzionale, *E. coli*, presenta diverse difficoltà, essenzialmente connesse con la tendenza degli ScFvs a formare aggregati insolubili quando sono prodotti in questo sistema [42]. Al fine di risolvere queste problematiche, sono stati esplorati diversi approcci sperimentali ad esempio la possibilità di produrre queste proteine con *chaperone* molecolari [27, 12], o abbassando la temperatura di espressione.

Quest'ultimo approccio è utilizzato spesso quando il prodotto ricombinante tende ad accumularsi sotto forma di corpi inclusi [2], dal momento che, come detto precedentemente, l'abbassamento della temperatura minimizza le interazioni idrofobiche [51], la forza trainante coinvolta nella formazione dei corpi inclusi [5]. Tuttavia, la coltivazione di *E. coli* a temperature sub-ottimali generalmente provoca una diminuzione della produttività in biomassa, dovuta all'effetto dell'abbassamento della temperatura sulla velocità di crescita specifica batterica, e quindi alla risposta fisiologica da *cold-shock* [7]. Per quanto detto finora, risulta evidente che l'uso di batteri naturalmente adattati al freddo come ospiti per la produzione di proteine ricombinanti potrebbe rappresentare un'efficace alternativa per migliorare la qualità conformazionale e la solubilità di questi prodotti proteici farmaceutici.

Per valutare quindi l'efficacia del sistema d'espressione psicrofilo nella produzione ricombinante di un frammento anticorpale, si è scelto di produrre come modello ScFvOx, il frammento variabile a singola catena anti-2-fenil-5-ossazolone [15]. ScFvOx è il tipico esempio di frammento anticorpale a singola catena tendente all'aggregazione, ed infatti esso è stato usato per anni come modello per lo sviluppo di protocolli di risolubilizzazione dai corpi inclusi [38]. La produzione ricombinante è stata indirizzata verso spazio periplasmatico per consentire la formazione dei ponti disolfurici dell'anticorpo. La produzione

e la localizzazione cellulare della proteina ricombinante è stata valutata tramite un'analisi di Western blotting, ed è stato messo a punto un processo di fermentazione su scala da laboratorio. Come mostrato nella Fig. 3, la proteina è interamente traslocata nello spazio periplasmatico e prodotta in forma solubile. Combinando opportunamente i segnali di indirizzamento, il sistema di espressione genica e la strategia di fermentazione, è stato possibile raggiungere una resa di produzione di  $4,69 \pm 0,12$  mg/L di ScFvOx solubile, che rappresenta la resa più elevata finora riportata per un sistema di espressione procariotico convenzionale anche in seguito alla risolubilizzazione di corpi inclusi [38]. Molto elevata è stata, inoltre, la resa in prodotto ( $Y_{P/X}$ ) registrata ( $Y_{P/X} = 0,94 \pm 0,03$  mg  $gX^{-1}$ ). Questo aspetto suggerisce che un ulteriore incremento nella resa di biomassa specifica consentirebbe di ottenere livelli di produzione più elevati di ScFvOx [18].



**Figura 3.** Produzione e localizzazione cellulare del frammento anticorpale ScFvOx prodotto nel batterio *P. haloplanktis* TAC125. Le cellule ricombinanti sono state recuperate, ed il loro estratto totale (estratto totale), le due sub-frazioni di estratto periplasmatico (periplasma) e l'estratto citoplasmatico (citoplasma) sono stati analizzati mediante Western Blotting, usando l'anticorpo primario anti-c-myc. Controllo, campione corrispondente ad estratto totale di cellule del batterio antartico non ricombinanti.

## 6. Produzione dell'anticorpo da camelide VHHD6.1

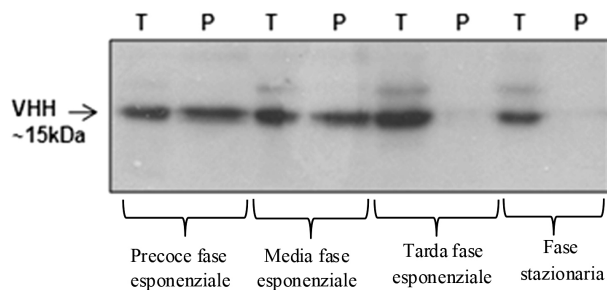
Fin dalla loro prima descrizione [23], gli anticorpi IgG da camelidi (cioè da cammelli, dromedari e lama) hanno attratto l'interesse degli scienziati, sia da un punto di vista della scienza di base che applicata, per via della loro caratteristica di "anticorpi a catena pesante" o HCAb (*Heavy-Chain Antibodies*). Questi anticorpi sono naturalmente privi delle catene leggere, il che rende le loro dimensioni significativamente più piccole di quelle degli anticorpi convenzionali. Come conseguenza, il loro domini di legame sono costituiti unicamente dai domini variabili della catena pesante, a cui si fa generalmente riferimento come VHHs [32], per distinguerli dai convenzionali VHs. Il VHH, quindi, rappresenta il frammento di legame all'antigene più piccolo (~15 kDa) e intatto a nostra disposizione, ed ha pertanto un grosso potenziale in applicazioni terapeutiche e diagnostiche come prodotto di fusione multi specifico [25].

Per la loro ridotta complessità strutturale, i VHHs sono generalmente prodotti con successo nelle piattaforme microbiche convenzionali, come *E. coli*. Tuttavia, c'è una frazione di VHHs che sfugge ai test di valutazione della capacità di legame in quanto manifesta una scarsa stabilità in forma solubile nell'ospite della produzione ricombinante. Queste molecole seppure dotate di un potenziale interessante sono fatalmente destinate ad essere trascurate, dal momento che la piattaforma di produzione microbica non ha caratteristiche ottimizzate per la produzione di anticorpi.

Al fine di valutare la capacità di *P. haloplanktis* TAC125 di produrre con successo in forma solubile un frammento anticorpale da camelide è stato scelto come proteina modello il VHHD6.1 *anti-human fibroblast growth factor receptor 1* (hFGFR1). Tale frammento anticorpale deriva da un processo di selezione mediante *phage display* su una *library naive* di VHHs di lama [31] ma la sua produzione in larga scala in *E. coli* è risultata inefficace in quanto la proteina ricombinante si accumula nei corpi inclusi (De Marco A., comunicazione personale). È stato quindi necessario sviluppare un nuovo processo produttivo che consentisse di ottenere VHHD6.1 in forma solubile di al fine di consentirne una più approfondita caratterizzazione.

La produzione del frammento anticorpale VHHD 6.1 anti-hFGFR1 è stata condotta in cellule di *P. haloplanktis* TAC125 ricombinanti con

il vettore pUCRP-*vhh*, in modalità *batch* nel terreno LIV ed nelle condizioni di crescita ed induzione precedentemente ottimizzate. L'analisi della produzione e della localizzazione cellulare del frammento anticorpale ricombinante è stata condotta mediante *Western blotting* semi quantitativo su estratti totali delle proteine solubili e su frazioni periplasmatiche di campioni collezionati a diversi tempi di crescita (Fig. 4). L'immunorivelazione, realizzata mediante l'utilizzo di anticorpi anti c-Myc, ha evidenziato la produzione solubile del VHHD6.1 ricombinante durante tutte le fasi della fermentazione e la sua corretta localizzazione periplasmatica durante la fase di crescita esponenziale precoce (22h) e media (29h). Al contrario non vi è traccia di proteina ricombinante nella frazione periplasmatica ottenuta da campioni collezionati in tarda fase esponenziale (42h) ed in fase stazionaria (60h). Il livello di produzione sembra incrementare durante la fase di crescita esponenziale, raggiungendo il massimo valore di resa in tarda fase esponenziale (42h). Inoltre, negli estratti solubili totali è possibile osservare la presenza di un segnale specifico dell'apparente peso molecolare di circa 30 kDa, molto probabilmente assegnabile alla formazione di complessi dimerici dell'anticorpo. La formazione di dimeri non è sorprendente alla luce della spiccata tendenza alla multimerizzazione manifestata sia da questo che da altri formati anticorpali quando



**Figura 4.** Produzione e localizzazione cellulare del frammento anticorpale VHH D6.1 prodotto nel batterio *P. haloplanktis* TAC125. Aliquote di cellule ricombinanti sono state recuperate a fasi successive della crescita cellulare e il loro estratto proteico totale (T) e la corrispondente frazione periplasmatica (P) sono state analizzate mediante Western Blotting usando l'anticorpo primario anti-c-myc.



la concentrazione locale nell'ospite della produzione ricombinante raggiunge livelli critici [24].

Un'altra osservazione interessante è la correlazione inversa tra l'aumento dell'intensità del segnale relativo al prodotto a più elevato peso molecolare e la diminuzione dell'efficienza della secrezione del prodotto ricombinante nello spazio periplasmatico. Una possibile interpretazione cinetica di questo fenomeno ipotizza che la velocità di dimerizzazione del VHH sia molto più rapida rispetto a quella di reclutamento del prodotto da parte del sistema di secrezione periplasmatico.

## 7. Produzione del frammento anticorpale 3H6 Fab

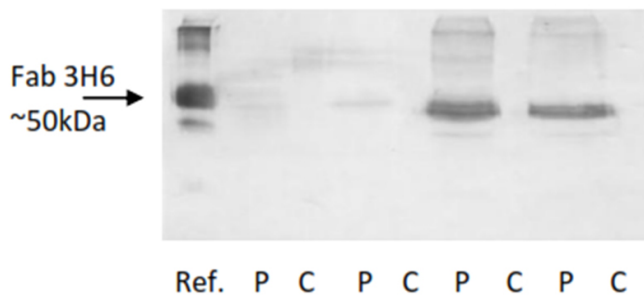
L'anticorpo anti-idiotipo Ab<sub>2</sub>/3H6 Fab è diretto contro l'anticorpo 2F5 [26], un neutralizzante ad ampio spettro del virus HIV-1, potenziale componente chiave nella formulazione di un vaccino contro HIV. Inoltre, tale proteina è stata scelta come modello nell'ambito di un progetto europeo teso all'analisi comparativa nella produzione proteica ricombinante in differenti ospiti microbici in quanto era nota la sua capacità di evocare il fenomeno detto UPR (*unfolded protein response*) quando prodotta in cellule di lievito [16].

Come precedentemente accennato, i frammenti anticorpali Fab sono eterodimeri costituiti da una catena leggera ed una pesante. Per questo motivo, per la produzione del 3H6 Fab in cellule di *P. haloplanktis* TAC125, è stato scelto di costruire un operone artificiale in cui i geni codificanti le due catene sono stati organizzati in modo da ottenerne una sintesi bilanciata grazie al fenomeno del *coupling* traduzionale (vedi Fig. 1). L'analisi della produzione ricombinante è stata condotta mediante esperimenti ELISA su estratti proteici solubili totali ottenuti da campioni di colture di *P. haloplanktis* (pUCRP-*fab*) prelevati a diversi tempi di coltura di un processo in *batch*, condotto in condizioni ottimizzate a 15°C. I risultati ottenuti dimostrano che il 3H6 Fab si accumula efficacemente durante la fermentazione, raggiungendo una concentrazione massima di  $3.99 \pm 0.11$  mg/L dopo circa 48 ore di crescita [17]. Alla fine del processo la resa di prodotto ricombinante è risultata pari a  $0.89 \pm 0.15$  mg/g<sup>-1</sup> di biomassa espressa come peso secco cellulare. Tale valore di resa è di circa 5 volte più

elevato di quanto ottenibile in *Pichia pastoris* e più di 50 volte maggiore della resa in *E. coli* e *S. cerevisiae* così come riportato in un recente lavoro [9]. Una successiva analisi della localizzazione cellulare e della corretta struttura quaternaria acquisita dal 3H6 Fab ricombinante prodotto nel batterio antartico è stata condotta mediante esperimenti di *Western blotting* di frazioni periplasmatiche e citoplasmatiche da campioni raccolti durante la fermentazione. La separazione elettroforetica del campione è stata effettuata in condizioni non-riducenti mentre l'immunorivelazione è stata realizzata usando anticorpi specifici anti-catena leggera anticorpale (Fig. 5). I risultati hanno evidenziato la presenza di segnali specifici corrispondenti al 3H6 Fab in forma eterodimerica (il peso molecolare apparente del complesso è pari a 50kDa) esclusivamente nelle frazioni periplasmatiche, a dimostrazione che il Fab non solo è prodotto efficientemente in forma solubile, ma è traslocato totalmente nello spazio periplasmatico. Infine, alla luce del peso molecolare apparente corrispondente al prodotto evidenziato nel *Western blotting* e, soprattutto, la completa assenza di segnali relativi alla catena leggera in forma libera (circa 25 kDa), suggeriscono che il prodotto ricombinante assume la corretta struttura quaternaria [17].

## 8. Conclusioni

In questa rassegna sono stati riassunti risultati recenti, ottenuti nei nostri laboratori sulla produzione ricombinante di frammenti anticorpali nel batterio antartico *P. haloplanktis* TAC125, che dimostrano come questo microrganismo possa essere considerato a buon diritto un ospite d'elezione per la sintesi di queste proteine dal particolare rilievo economico. Infatti, tutti e tre i frammenti anticorpali selezionati per la produzione ricombinante nell'ospite antartico sono stati prodotti in forma solubile e correttamente assemblata, anche in virtù della scelta del percorso di secrezione periplasmatica co-traduzionale SRP-dipendente. Infatti, solo nel caso della produzione dell'anticorpo da camélide VHHD6.1 il sistema di traslocazione attraverso la membrana interna è risultato in qualche maniera inefficace quando la crescita raggiunge elevate densità cellulari. In tutti e tre i processi, comunque, l'ospite psicrofilo è stato in grado di produrre i frammenti anticorpali con rese paragonabili, se non largamente superiori, a quanto ottenuto nei sistemi di



**Figura 5.** Produzione e localizzazione cellulare del frammento anticorpale Fab3H6 prodotto nel batterio *P. haloplanktis* TAC125. Aliquote di cellule ricombinanti sono state recuperate a fasi successive della crescita cellulare; il loro estratto proteico citoplasmatico (C) e la corrispondente frazione periplasmatica (P) sono state analizzate mediante Western Blotting usando l'anticorpo primario anti-c-myc. RIF, campione di Fab3H6 prodotto in maniera ricombinante in *Pichia pastoris*. L'analisi elettroforetica SDS-PAGE è stata condotta in condizioni non riducenti per cui l'analisi di immunorivelazione evidenzia il Fab3H6 in forma eterodimerica (50 kDa).

espressione convenzionali, quali *E. coli*, *S. cerevisiae* o *P. pastoris*. La particolare capacità di *P. haloplanktis* TAC125 di produrre frammenti anticorpali ricombinanti di elevata qualità ha comunque indotto ad approfondire, laddove possibile, l'analisi delle caratteristiche cellulari che possano giustificarla. A tal riguardo, numerosi studi dei processi di *fold*ing delle molecole anticorpali hanno evidenziato il ruolo critico svolto dalle PPIasi, una classe di enzimi coinvolti nell'isomerizzazione *cis-trans* del legame X-Pro in polipeptidi. In un recente lavoro, Levy e coautori [27] hanno dimostrato che la co-espressione di FkpA, una PPIasi periplasmatica di *E. coli*, ha determinato in questo batterio un aumento significativo della secrezione periplasmatica di frammenti scFv funzionali, derivanti sia da catene V $\kappa$  (e, quindi, contenenti proline in conformazione *cis*) che catene V $\lambda$ , non dotate di *cis*-proline. Tali risultati hanno anche suggerito che l'effetto di FkpA sia legato oltre che alla sua attività enzimatica PPIasi anche a quella di *chaperone* molecolare.

La velocità della reazione di isomerizzazione *cis-trans* del legame X-Pro può comunque divenire un processo limitante durante il *fold*ing

proteico quando la temperatura si approssima al punto di congelamento dell'acqua. La recente osservazione che all'abbassamento della temperatura di crescita, *P. haloplanktis* TAC125 sovraesprime il *trigger factor*, lo *chaperone* molecolare che interagisce con il ribosoma ed è dotato anche di attività PPIasica, sembra ricondurre alla centralità di questo fenomeno nell'adattamento alla crescita alle basse temperature di questo microrganismo [39].

Un'altra interessante ipotesi di strategia adattativa alla psicrofilia deriva dallo studio di genomi di batteri polari, nei quali è spesso osservato un aumento nel numero di geni codificanti PPIasi che può accompagnarsi ad una riduzione della distribuzione dei residui di prolina nel proteoma codificato [13]. Per questo motivo, il genoma di *P. haloplanktis* TAC125 è stato analizzato alla ricerca di geni codificanti enzimi ad attività PPIasica. I risultati di tale analisi sono riassunti nella Tab. 1 dove sono riportati anche i 10 geni che codificano PPIasi nel batterio mesofilo *E. coli*. In accordo con quanto precedentemente ipotizzato, il genoma del batterio antartico contiene un numero superiore (15) di geni codificanti PPIasi, 10 dei quali codificano l'omologo psicrofilo delle proteine mesofile [18]. Dei 5 geni aggiuntivi posseduti da *P. haloplanktis* TAC125, due rappresentano duplicazioni dei geni codificanti le proteine SlyD e PpiC, mentre gli altri tre geni codificano una PPIasi citoplasmatica e due periplasmatiche (Tab. 1). In sintesi, alla luce della comparazione della distribuzione di enzimi ad attività PPIasi tra i due batteri, è possibile concludere che il batterio antartico possiede tre PPIasi citoplasmatiche e due PPIasi periplasmatiche in più rispetto a *E. coli*, osservazione che può giustificare le peculiari proprietà di *P. haloplanktis* TAC125 come ospite naturalmente ottimizzato per la produzione ricombinante di proteine o frammenti proteici stabilizzati da ponti disolfurici [18].

Più in generale, i nostri risultati dimostrano definitivamente che la produzione di proteine ricombinanti in questo batterio psicrofilo non è solo una tecnologia ormai affidabile, ma può essere una valida strategia per attenuare i problemi di solubilità o di *foldings* scorretto che si sperimentano talora in sistemi di espressione convenzionali, come *E. coli*. Inoltre, *P. haloplanktis* TAC125 e la strategia di espressione genica messa a punto hanno dimostrato un interessante potenziale biotecnologico come piattaforma non convenzionale di produzione di proteine ricombinanti di valore significativo, come i frammenti anticorpali.

**Tabella 1.** Distribuzione dei geni codificanti enzimi ad attività peptidil–prolil cis–trans isomerasi nel genoma del batterio antartico *P.haloplanktis* TAC125 consultabile attraverso la piattaforma Mage\*.

Nome del gene	<i>Ph</i> TAC125	Annotazione riportata in MAGE Gene*	Localizzazione cellulare
slyDB	PSHAa0292	Peptidil–prolil cis–trans isomerasi, famiglia delle FKBP	citoplasma
slyDA	PSHAa0721	Peptidil–prolil cis–trans isomerasi, famiglia delle rotamasi	citoplasma
fkpB	PSHAa0920	Peptidil–prolil cis–trans isomerasi, famiglia delle rotamasi	citoplasma
	PSHAa1034	Peptidil–prolil cis–trans isomerasi, famiglia delle rotamasi	citoplasma
fklB	PSHAa1414	Peptidil–prolil cis–trans isomerasi, famiglia delle rotamasi	citoplasma
ppiC	PSHAa2488	peptidil–prolil cis–trans isomerasi C (rotamasi C)	citoplasma
ppiC	PSHAa0308	peptidil–prolil cis–trans isomerasi C (rotamasi C)	citoplasma
tig	PSHAa2063	peptidil–prolil cis–trans isomerasi ( <i>trigger factor</i> ), <i>chaperone</i> molecolare coinvolto nella divisione cellulare	citoplasma
ppiB	PSHAa2066	peptidil–prolil cis–trans isomerasi B (rotamasi B)	citoplasma
ppiD	PSHAa2058	peptidil–prolil cis–trans isomerasi D (PPlasi D) (Rotamasi D)	associata alla membrana interna
fkpA	PSHAa2901	putativa peptidil–prolil cis–trans isomerasi	associata alla membrana interna
surA	PSHAa2633	peptidil–prolil cis–trans isomerasi (PPlasi D)	spazio periplasmatico
ppiA	PSHAa0347	putativa peptidil–prolil cis–trans isomerasi	spazio periplasmatico
	PSHAa1981	putativa peptidil–prolil cis–trans isomerasi (PPlasi)	spazio periplasmatico
	PSHAa2247	putativa peptidil–prolil isomerasi	spazio periplasmatico

\*<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php>

## References

- [1] ARBABI-GHAHROUDI M., TANHA J., R. MACKENZIE, 2005. *Prokaryotic expression of antibodies*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 24, 501–519.
- [2] BANEYX F., 1999. *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411–421.
- [3] BIROLO L., TUTINO M.L., FONTANELLA B., GERDAY C., MAINOLFI K., PASCARELLA S., SANNIA G., VINCI F., G. MARINO, 2000. *Aspartate aminotransferase from the Antarctic bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125. Cloning, expression, properties, and molecular modelling*. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2790–2802.
- [4] CABEINER L.M., SURANA R., WANG S., 2010. *Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy*. *Nature Reviews Immunology*, 10, 317–327.
- [5] CARRIO M., GONZALEZ-MONTALBAN N., VERA A., VILLAVERDE A., S. VENTURA, 2005. *Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies*. *Journal of Molecular Biology*, 347, 1025–1037.
- [6] CHATZI K.E., SARDIS M.F., KARAMANOU S., A. ECONOMOU, 2013. *Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system*. *Biochemical Journal*, 449, 25–37.
- [7] COLEMAN M.E., TAMPLIN M.L., PHILLIPS J.G., B.S. MARMER, 2003. *Influence of agitation, inoculum density, pH, and strain on the growth parameters of Escherichia coli O157:H7—relevance to risk assessment*. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 147–160.
- [8] DALBEY R.E., M. CHEN, 2004. *Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694, 37–53.
- [9] DRAGOSITS M., FRASCOTTI G., BERNARD-GRANGER L., VAZQUEZ F., GIULIANI M., BAUMANN K., RODRIGUEZ-CARMONA E., TOKKANEN J., PARRILLI E., WIEBE M. G., KUNERT R., MAURER M., GASSER B., SAUER M., BRAN DUARDI P., PAKULA T., SALOHEIMO M., PENTTILA M., FERRER P., TUTINO M.L., VILLAVERDE A., PORRO D., D. MATTANOVICH, 2011. *Influence of growth temperature on the production of antibody Fab fragments in different microbes: a host comparative analysis*. *Biotechnology Progress*, 27, 38–46.
- [10] DUILIO A., TUTINO M.L., G. MARINO, 2004. *Recombinant protein production in Antarctic Gram negative bacteria*. *Methods in Molecular Biology*, 267, 225–237.
- [11] DUILIO A., MADONNA S., TUTINO M.L., PIROZZI M., SANNIA G., G. MARINO,

2004. *Promoters from a cold-adapted bacterium: definition of a consensus motif and molecular characterization of UP regulative elements*. *Extremophiles*, 8, 125–132.
- [12] FEIGE M.J., HENDERSHOT L.M., J. BUCHNER, 2010. *How antibodies fold*. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 189–198.
- [13] FELLER G., 2013. *Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology*. Scientifica (Cairo). 2013;2013:512840.
- [14] FERRER–MIRALLES N., DOMINGO–ESPÍN J., CORCHERO J.L., VÁZQUEZ E., A VILLAYERDE, 2009. *Microbial factories for recombinant pharmaceuticals*. *Microbial Cell Factories*, 8, 17.
- [15] FIEDLER U., CONRAD U., 1995. *High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds*. *Biotechnology (N Y)* 13, 1090–1093.
- [16] GASSER B., MAURER M., RAUTIO J., SAUER M., BHATTACHARYYA A., SALOHEIMO M., PENTTILÄ M., D. MATTANOVICH, 2007. *Monitoring of transcriptional regulation in Pichia pastoris under protein production conditions*. *Bio Med Central Genomics*, 8, 179.
- [17] GIULIANI M., PARRILLI E., FERRER P., BAUMANN K., MARINO G., M.L. TUTINO, 2011. *Process optimization for recombinant protein production in the psychrophilic bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Process Biochemistry*, 46, 953–959.
- [18] GIULIANI M., PARRILLI E., SANNINO F., APUZZO G.A., MARINO G., TUTINO M.L., 2014. *Recombinant production of a single-chain antibody fragment in Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2014 Feb 18. [Epub ahead of print].
- [19] —, 2014. *Soluble recombinant protein production in Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125*. *Methods Molecular Biology*, In press.
- [20] GOT P.A., J.M. SCHERRMANN, 1997. *Stereoselectivity of antibodies for the bioanalysis of chiral drugs*. *Pharmaceutical Research*, 14, 1516–1523.
- [21] GRAHAM B.M., PORTER A.J., W.J. HARRIS, 1995. *Cloning, expression and characterization of a single chain antibody fragment to the herbicide paraquat*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 63, 279–289.
- [22] GRUDNIK P., BANGE G., I. SINNING, 2009. *Protein targeting by the signal recognition particle*. *Biological Chemistry*, 390, 775–782.
- [23] HAMERS–CASTERMAN C., ATARHOUGH T., MUYLDERMANS S., 1993. *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. *Nature* 363, 446–448.

- [24] HOLLINGER P., HUDSON P.J., 2005. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. *Nature Biotechnology*, 23, 1126–1136.
- [25] JOOSTEN V., LOKMAN C., C. VAN DEN HONDEL, 2003. *The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi*. *Microbial Cell Factories*, 2, 1.
- [26] KUNERT R.E., WEIK R., FERKO B., STIEGLER G., H. KATINGER, 2002. *Anti-idiotypic antibody Ab2/3H6 mimics the epitope of the neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody 2F5*. *AIDS*; 16, 667–668.
- [27] LEVY R., AHLUWALIA K., BOHMANN D.J., GIANG H.M., SCHWIMMER L.J., ISSAFRAS H., REDDY N.B., CHAN C., HORWITZ A.H., T. TAKEUCHI, 2013. *Enhancement of antibody fragment secretion into the Escherichia coli periplasm by co-expression with the peptidyl prolyl isomerase, FkpA, in the cytoplasm*. *Journal of Immunological Methods*, 394, 10–21.
- [28] LIAO Y.D., JENG J.C., WANG C.F., WANG S.C., S.T. CHANG, 2004. *Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered E. coli methionine aminopeptidase*. *Protein Science*, 13, 1802–1810.
- [29] MEDIGUE C., KRIN E., PASCAL G., BARBE V., BERNSSEL A., BERTIN P. N., CHEUNG F., CRUVEILLER S., D'AMICO S., DUILIO A., FANG G., FELLER G., HO C., MANGENOT S., MARINO G., NILSSON J., PARRILLI E., ROCHA E.P., ROUY Z., SEKOWSKA A., TUTINO M.L., VALLENET D., VON, H.G., A. DANCHIN, 2005. *Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125*. *Genome Research*, 15, 1325–1335.
- [30] MERGULHAO F.J., SUMMERS D.K., G.A. MONTEIRO, 2005. *Recombinant protein secretion in Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 23, 177–202.
- [31] MONEGAL A., AMI D., C. MARTINELLI, 2009. *Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naïve library*. *Protein Engineering, Design and Selection*, 22, 273–280.
- [32] MUYLDERMANS S., M. LAUWEREYS, 1999. *Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies*. *Journal of Molecular Recognition*, 12, 131–140.
- [33] OPPENHEIM D., C. YANOFSKY, 1980. *Translational coupling during expression of the tryptophan operon in Escherichia coli*. *Genetics*, 95, 785–795.
- [34] PAPA R., RIPPA V., SANNIA G., MARINO G., A. DUILIO, 2007. *An effective cold inducible expression system developed in Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125*. *Journal of Biotechnology*, 127, 199–210.
- [35] PARRILLI E., CUSANO A.M., GIULIANI M., M.L. TUTINO, 2006. *Cell engi-*



- neering of *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125: construction of a mutant strain with reduced *exo*-proteolytic activity. *Microbial Cell Factories*, 5(Suppl 1), P36.
- [36] PARRILLI E., DE VIZIO D., CIRULLI C., M.L. TUTINO, 2008. *Development of an improved Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 strain for recombinant protein secretion at low temperature. *Microbial Cell Factories*, 7, 2.
- [37] PARRILLI E., GIULIANI M., MARINO G., M.L. TUTINO, 2010. *Influence of production process design on inclusion bodies protein: the case of an Antarctic flavohemoglobin*. *Microbial Cell Factories* 9, 19.
- [38] PATIL G., RUDOLPH R., C. LANGE, 2008. *In vitro*-refolding of a single-chain Fv fragment in the presence of heteroaromatic thiols. *Journal of Biotechnology*, 134, 218–221
- [39] PIETTE F., D'AMICO S., STRUVAY C., MAZZUCHELLI G., RENAUT J., TUTINO M.L., DANCHIN A., LEPRINCE P., G. FELLER 2010. *Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Molecular Microbiology*, 76, 120–132.
- [40] RATTENHOLL A., LILIE H., GROSSMANN A., STERN A., SCHWARZ E., R. RUDOLPH, 2001. *The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies*. *European Journal of Biochemistry*, 268, 3296–3303.
- [41] SCHIERLE C.F., BERKMAN M., HUBER D., KUMAMOTO C., BOYD D., J. BECKWITH, 2003. *The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the Escherichia coli periplasm via the signal recognition particle pathway*. *Journal of Bacteriology*, 185, 5706–5713.
- [42] SOMERVILLE J.E. JR., GOSHORN S.C., FELL H.P., R.P. DARVEAU, 1994. *Bacterial aspects associated with the expression of a single-chain antibody fragment in Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 595–603.
- [43] SPEED M.A., WANG D.I., J. KING, 1996. *Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition*. *Nature Biotechnology*, 14, 1283–1287.
- [44] THIE H., SCHIRRMANN T., PASCHKE M., DUBEL S., M. HUST, 2008. *SRP and Sec pathway leader peptides for antibody phage display and antibody fragment production in E. coli*. *Nature Biotechnology* 25, 49–54.
- [45] TUTINO M.L., DUILIO A., PARRILLI R., REMAUT E., SANNIA G., G. MARINO, 2001. *A novel replication element from an Antarctic plasmid as a tool for the*

- expression of proteins at low temperature. Extremophiles*, 5, 257–264.
- [46] TUTINO M.L., PARRILLI E., GIAQUINTO L., DUILIO A., SANNIA G., FELLER G., G. MARINO, 2002. *Secretion of alpha-amylase from Pseudoalteromonas haloplanktis TAB23: two different pathways in different hosts*. *Journal of Bacteriology*, 184, 5814–5817.
- [47] VIGENTINI I., MERICO A., TUTINO M.L., COMPAGNO C., G. MARINO, 2006. *Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal Biotechnology*, 127, 141–150.
- [48] VINCI F., CATHARINO S., FREY S., BUCHNER J., MARINO G., PUCCI P., M. RUOPPOLO, 2004. *Hierarchical formation of disulfide bonds in the immunoglobulin Fc fragment is assisted by protein-disulfide isomerase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 15059–15066.
- [49] WICKNER W., M.R. LEONARD, 1996. *Escherichia coli preprotein translocase*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 29514–29516.
- [50] WILMES B., HARTUNG A., LALK M., LIEBEKE M., SCHWEDE, T., P. NEUBAUER, 2010. *Fed-batch process for the psychrotolerant marine bacterium Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Microbial Cell Factories*, 9, 72.
- [51] YANG A.S., SHARP K.A., B. HONIG, 1992. *Analysis of the heat capacity dependence of protein folding*. *Journal of Molecular Biology*, 227, 889–900.
- [52] YOKOTA T., MILENIC D.E., WHITLOW M., J. SCHLOM, 1992. *Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms*. *Cancer Research*, 52, 3402–3408.

Maria Giuliani, Ermenegilda Parrilli, Filomena Sannino, Gennaro Antonio Apuzzo, Maria Luisa Tutino, Gennaro Marino  
Dipartimento di Scienze Chimiche, Università “Federico II”, Napoli  
Istituto di Biochimica delle Proteine, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli  
maria.giuliani@ymail.com; erparril@unina.it; filomena.sannino2@unina.it  
gen.apuzzo@gmail.com; marino@unina.it; tutino@unina.it