

Artículo II

Co-activation of antibody-responsive, enzymatic sensors by a recombinant scFv antibody fragment produced in *E. coli*

P. Alcalá, N. Ferrer-Miralles, J.X. Feliu and A. Villaverde

Biotechnology Letters **24**, 1543-1551 (2002)

RESUMEN

En el presente estudio se ha clonado y producido en *Escherichia coli* un fragmento scFv recombinante del anticuerpo monoclonal SD6, dirigido contra un péptido vírico antigénico, expuesto en un modelo de biosensor basado en el enzima β -galactosidasa. Los resultados indicaron que la unión del scFv no causaba ninguna respuesta enzimática mientras que la presencia simultánea del scFv y del fragmento Fab del SD6 daba como resultado una respuesta eficiente pero no aditiva del sensor, cuya actividad enzimática aumentaba hasta en un 200%. Este efecto cooperativo que también se pudo observar cuando se combinaban el scFv y el fragmento Fab de un anticuerpo no homólogo denominado 4C4, permite postular que la reactivación enzimática requiere contactos múltiples y probablemente heterogéneos entre el sensor molecular y los analitos, y que no es necesaria la interacción con ligandos moleculares bivalentes para que se produzca dicha modulación de actividad.



Co-activation of antibody-responsive, enzymatic sensors by a recombinant scFv antibody fragment produced in *E. coli*

Pilar Alcalá, Neus Ferrer-Miralles¹, Jordi X. Feliu² & Antonio Villaverde*

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; Present addresses: ¹Microbiology Unit, Universitat Pompeu Fabra, Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona, and ²Departament de Biologia Molecular, Biokit, S.A. 08186 Lliçà d'Amunt, Barcelona, Spain

*Author for correspondence (Fax: +34 935812011; E mail: avillaverde@servet.uab.es)

Received 9 May 2002; Revisions requested 30 May 2002; Revisions received 15 July 2002; Accepted 17 July 2002

Key words: antigen, foot and mouth disease virus, β -galactosidase, recombinant antibody, regulable enzyme, scFv

Abstract

The biophysical nature of the signal transduction in enzymatic biosensors through which the paratope-epitope interaction enhances enzyme activity, is essentially unknown. Fab fragments of efficiently activating antibodies are, in general, poor sensor activators suggesting that the bivalent antibody binding could contribute to the sensing process. We have cloned and produced in *E. coli* a recombinant SD6 scFv fragment directed against a sensing peptide, displayed on a model β -galactosidase-based biosensor. While the enzymatic response to scFv-binding is not detectable, the simultaneous presence of scFv and the poorly-activator SD6 Fab fragment results in a non-additive, efficient sensor response, enhancing the enzyme activity up to about 200%. This co-operative effect, which is also observed by combining SD6 scFv and the non-homologous anti-peptide 4C4 Fab, confirms that the enzyme up-regulation requires multiple and probably heterogeneous contacts between the sensor molecule and the analytes, but not necessarily done by bivalent molecular ligands.

Introduction

Molecular sensing is becoming a matter of increasing interest because of its potential for analyte detection in unconventional diagnostic approaches. A few enzymes, such as β -lactamase (Legendre *et al.* 1999), β -galactosidase (Benito *et al.* 1996), alkaline phosphatase (Brennan *et al.* 1995), green fluorescent protein (Doi & Yanagawa 1999) and P22 tailspike protein (Ramírez *et al.* 1999), have been engineered to accommodate sensing elements (mainly short antigenic peptides). Being displayed on the enzyme surface, these protein segments are able to translate the molecular interaction (mainly with an antibody) into detectable variations of the enzymatic activity. The β -galactosidase of *Escherichia coli*, consisting of four identical subunits, allows multiple peptide display at convenient insertion sites and therefore multivalent analyte binding. Together with the simplicity of assaying

β -galactosidase activity and the availability of different substrates, this enzyme is an excellent candidate for fast antibody detection in biosensor-based homogeneous assays. In this context, further investigation by using peptide models of foot-and-mouth disease virus (FMDV) has permitted the examination of the enzymatic performance under antibody-binding (Feliu *et al.* 1998a, 2000) and, later, the generation of a β -galactosidase-based assay for the sensitive detection of anti-HIV antibodies in human sera (Ferrer-Miralles *et al.* 2001).

Despite this, the molecular basis of antibody-mediated enzyme regulation remains unsolved. The interaction between antigen and antibody might alter the conformational status of the active site in the carrier enzyme, to allow either a better substrate diffusion or its faster hydrolysis (Ferrer-Miralles *et al.* 2000). On the other hand, the Fab fragment of a highly activating, monoclonal antibody is unable to produce any

detectable signal despite actual binding to the paradigm protein sensor M278VP1 (Ferrer-Miralles *et al.* 2000). Therefore, it can be postulated that the bivalent antibody binding, involving different β -galactosidase monomers, might be contributing to enzyme activation through a whole enzyme stabilisation, a co-operative enhancement of the locally induced fit or a combination of both events. In the present study, by exploring the enzymatic response in front a recombinant anti-peptide scFv, we conclude that multiple enzyme contacts are indeed required for enzymatic modulation, but that the activation signal can be efficiently triggered by monovalent interactions carried out by independent sensor-binding ligand molecules.

Material and methods

Molecular cloning and plasmid construction

The hybridoma cell line SD6, producing an anti-foot-and-mouth disease virus (FMDV) monoclonal antibody, was cultured as described (Jiménez *et al.* 1986). After reaching 10^6 cells ml^{-1} , cells were harvested by centrifugation and total mRNA extracted and purified by affinity chromatography by using the QuickPrep mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) and according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from mRNA template with Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase and random hexadeoxyribonucleotides [pd(N)₆] primers ('Recombinant Phage Antibody System', Amersham Pharmacia Biotech). The variable regions of heavy chain (V_H) and kappa light chain (V_K) were amplified from first-strand cDNA by polymerase chain reaction (PCR), by using the heavy primers 1 and 2 and a light primer mix (Amersham Pharmacia Biotech). The scFv DNA was generated by PCR fusion of V_H and V_K segments via a short DNA fragment encoding a 15 amino acid-flexible peptide (Gly₄Ser)₃ (Amersham Pharmacia Biotech). An additional PCR reaction was carried out for the addition of vector-compatible restriction sites (*SfiI/NotI*) to both ends of the single-chain-encoding DNA fragment. The assembled scFv DNA was digested with *SfiI* and *NotI* restriction enzymes, gel purified, and then inserted into the phagemid isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible pCANTAB5E expression vector (Amersham Pharmacia Biotech). This material was used to transform electrocompetent *E. coli* XL-1 Blue

cells. By using this cloning system, a 13 amino acid long E-tag for easy scFv immunodetection results fused to the carboxy terminus of the antibody segment.

Bacterial strains and culture conditions

Transformed XL-1 Blue cells (*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *relA1lac⁻*, F'[*proAB⁺*, *lacI^q*, *lacZ Δ M15*], Tn10(*tet^r*)] were plated on SOBAG medium (20 g Bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract and 0.5 g NaCl per liter medium, plus 1 M MgCl₂, 2 M glucose and 100 μg ampicillin ml^{-1}) and incubated at 30 °C overnight. Colonies were pooled and plasmid DNA was obtained by standard alkaline extraction procedures (Sambrook *et al.* 1989). The non-suppressor *E. coli* strain HB2151 (K12 Δ (*lac-pro*), *ara*, *nal^r*, *thi*/F'[*proAB*, *lacI^q*, *lacZ Δ M15*]) was transformed with the plasmidic DNA for production of soluble scFv antibodies. The transformed cells were plated in SOBAG medium supplemented with 100 μg nalidixic acid per ml and incubated at 30 °C overnight.

Screening for ScFv production and DNA sequencing

Screening for colonies producing scFvs was performed in an *in situ* immunoanalysis on HB2151 colonies by using the HRP/Anti-E Tag Conjugate (Amersham Pharmacia Biotech), following the procedure of Hanahan & Meselson (1980). From plate replicas of the glucose-containing agar medium 2x YT-AG (17 g Bacto-tryptone, 10 g Bacto-yeast extract, 5 g NaCl per liter medium, plus 2% w/w glucose and 100 μg ampicillin ml^{-1}), the selection of those clones producing antigen-specific scFvs was also done by using the HRP/Anti-E Tag in a colony lift assay, according to the manufacturer's instructions. Briefly, nitrocellulose membrane filters were coated with synthetic peptide GH23, a SD6-target antigen that reproduces amino acids 134–156 of FMDV VP1 (Carbonell *et al.* 1998), by incubation at 25 °C for 20 min at 10 μg ml^{-1} in carbonate buffer. Then, filters were placed onto the surface of a glucose-deficient agar medium 2x YT-AI (2xYT plus 100 μg ampicillin ml^{-1} and 1 mM IPTG) in a second Petri dish. HB2151 colonies were lifted from the surface of the master plate by using a fresh piece of nitrocellulose that was carefully layered (colony-side up) onto the surface of the antigen-coated nitrocellulose filter in the second Petri dish. The cells on this master filter were incubated overnight at 30 °C to allow scFv production, in contact with the antigen-coated filter. The master

A. Amino acid sequences of V_H domains

	10	30	50	70
mAb SD6	SGGGLVKPGGSLKLSCTAS	GGFIENRCAMSWVRQTPEKRLEWVA	TISSGGTYTY	YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS
scFv 93	SGGGLVKPGGSLKLSCTAS	GGFIENRCAMSWVRQTPEKRLEWVA	TISSGGTYTY	YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS
scFv 73	SGGGLVKPGGSLKLSCTAS	GGFIENRCAMSWVRQTPEKRLEWVA	TISSGGTYTY	YPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS
		CDR1	CDR2	
	90	110		
mAb SD6	LRSADTAMYYCV	RREDGGDEGF	FAYWGQGT	VTVVSAAKT
scFv 93	LRSADTAMYYCV	RREDGGDEGF	FAYWGQGT	T*VTVVS*SGGGGSGGGGSGGGGS
scFv 73	LRSADTAMYYCV	RREDGGDEGF	FAYWGQGT	T*VTVVS*SGGGGSGGGC*SGGGGS
		CDR3	linker	

B. Amino acid sequences of V_K domains

	10	30	50	70
mAb SD6	LTQSPASLAVSLGQRATISCR	RASESVDSGGHSE	MHWYQQKPGQP	PKLLIYRASNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLTIDPV
scFv 93	LT*HSPASLAVSLGQRATISCR	RASESVDSGGHSE	MHWYQQKPGQP	PKLLIYRASNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLTIDPV
scFv 73	LTQSPASLAVSLGQRATISCR	RASESVDSGGHSE	MHWYQQKPGQ*	SPKLLIYRASNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLTIDPV
		CDR1	CDR2	
	90	110		
mAb SD6	EADDVATYYCQ	QSNEVPLT	FGAGTKL	DLKRA
scFv 93	EADDVATYYCQ	QSNEVPLT	FGAGTKL	ELIKR
scFv 73	EADDVATYYCQ	QSNEVPLT	FGAGTKL	ELIKR
		CDR3		

Fig. 1. Comparison of the deduced amino acid sequences of V_H (A) and V_K (B) domains in mAb SD6, scFv93 and scFv73, with that described for mAb SD6 (Verdaguer *et al.* 1996). The complementarity-determining regions (Kabat *et al.* 1987) appear in boxes. The linker (Gly₄Ser)₃ between the V_H and V_K domains is underlined. Asterisks indicate positions with differences between the predicted amino acid sequences (in bold face).

filter was then removed and stored (colony-side up) at 4 °C on sterile agar medium. The antigen-coated filter was probed with HRP/Anti-E Tag Conjugate and developed with 4-chloro-1-naphthol, to detect E-tagged scFvs bound to the antigen on the filter surface. Finally, the master filter was aligned with the antigen-coated filter to identify and recover those colonies producing E-tagged scFvs and also reactive with the antigen.

Plasmid DNA from those positive clones was isolated by alkaline lysis (Sambrook *et al.* 1989). V_H and V_K DNA segments in the plasmids were sequenced on both strands with the pCANTAB5 sequence primer set (Amersham Pharmacia Biotech), by using Taq cycle sequencing and dye terminator chemistry at the UAB Sequencing Facility. Sequence comparisons were done by using the BLAST program.

Production of soluble scFv

E. coli HB2151 clones positive in the colony lift assay were cultured in 2x YT-AG medium at 30 °C with 250 rpm shaking until they reached an A₆₀₀ of 0.5. Production of scFv fragments was induced with 1 mM IPTG, and the cells were incubated in a shaker at 30 °C

overnight. Supernatants containing the extracellular soluble scFv antibodies were separated from the cell pellets by centrifugation at 1500 × *g* for 20 min and filtered through a 0.45 μm pore size filter. Cell pellets were resuspended in disruption buffer and sonicated as described (Feliu *et al.* 1998b). The cell culture medium containing soluble antibodies was concentrated 100 times by using a Centricon Plus-80 filter (Millipore) with a 10 kDa cut off, and antibodies were purified using a HiTrap anti-E Tag column (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions.

SDS-PAGE and Western blot analysis

Supernatants, and the soluble and insoluble cellular fractions obtained by sonication were resuspended in 4× loading buffer, heated for 10 min at 95 °C and subjected to SDS-PAGE (12% polyacrylamide) with a 0.5-mm-thick gel in a Bio-Rad Mini-Protein II Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). See-Blue Pre-stained SDS-PAGE standards (Invitrogen) were used to calibrate protein mobilities. After separation, gels were electroblotted on nitrocellulose membranes and protein bands were immunode-

tected using an anti-E tag antibody and then incubated first with goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) diluted 1:2000 and then with H₂O₂ and 4-chloro-1-naphthol as a substrate. Developed membranes were scanned and the digitalized images were analysed and quantified with Quantity One (Bio-Rad) software. At least 4 different determinations were done for each sample. Variations between these determinations were not significant, and no degradation bands were observed in any case.

ELISA

Several ELISAs were developed and used to determine the sensitivities and specificities of the scFv antibodies. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4 °C with 2 pmol either of protein M278VP1, JX795A or LACZ in carbonate buffer as coating antigens. Proteins M278VP1 and JX795A contain the GH23 viral segment inserted in positions 279 and 795 of β -galactosidase, respectively (Feliu & Villaverde 1998). LACZ was used as a negative control for specificity. ELISA plates were blocked with 0.2% Tween 20 in PBS (BB solution) for 1 h at room temperature and then washed with 0.05% Tween 20 in PBS. A hundred μ l of a solution containing scFv or mAb SD6, at concentrations ranging from 0.06 to 18.7 ng μ l⁻¹ in BB were added and plates incubated for 2 h at room temperature. After several washing steps, the bound scFv or mAb were detected by using either peroxidase-conjugated anti-E Tag (Amersham Pharmacia Biotech) (100 μ l of a 1:8000 dilution) or peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Bio-Rad) (100 μ l of a 1:2000 dilution) respectively, and developed with 3-dimethylaminobenzoic acid, 3-methyl-2-benzotriazinolone (Sigma) and H₂O₂ as substrates. The reaction was stopped by adding 50 μ l 2 M H₂SO₄, and the absorbance was read at 620 nm.

Modulation assay

Antibody-mediated enzymatic modulation was determined in ELISA microtiter plates as described (Feliu *et al.* 1998a). Two picomoles of either M278VP1 or JX795A proteins were incubated in 80 μ l Z buffer with 1% (w/v) BSA in presence or absence of equimolar amounts of either SD6 mAb, SD6 Fab or scFv for 1 h at 28 °C. Then, 40 μ l 2 mg ONPG ml⁻¹ were added, and when the reaction turned yellow it was stopped with 50 μ l 1 M Na₂CO₃. The absorbance at 414 nm was read in a Labsystems iEMS Reader MF. All experiments were performed in triplicate.

To determine an eventual competition between Fab SD6 and scFv for binding to the viral peptide displayed on the protein, a slight modification of the modulation assay was performed. Briefly, two picomoles of protein M278VP1 were pre-incubated with or without 10 μ l of different scFv concentrations ranging from 1.25 to 12.5 ng μ l⁻¹ in Z buffer with 1% (w/v) BSA for 30 min at 28 °C. Then, 10 μ l of a defined concentration of either Fab SD6 or Fab 4C4 was added and incubated for another 30 min. Next, 40 μ l of 2 mg ONPG ml⁻¹ were added and when the reaction turned yellow it was stopped with 50 μ l 1 M Na₂CO₃ and the absorbance read at 414 nm. As a negative control, protein was pre-incubated with or without cellular supernatants that do not produce scFv. Values were obtained as the relative activity between the protein in contact with antibodies and of the same protein without any antibody, expressed as a percentage. All experiments were performed in triplicate.

Determination of enzymatic constants

The β -galactosidase enzymatic assay was carried out in ELISA microtitre plates. In all cases, 2 pmol of each enzyme in 50 μ l Z buffer without 2-mercaptoethanol were incubated for 1 h at 28 °C either in the presence or absence of 6.25 μ g ml⁻¹ 4C4 mAb, 4.17 μ g ml⁻¹ 4C4 Fab fragment or a combination of 4.17 μ g ml⁻¹ 4C4 Fab fragment and 1.25 μ g ml⁻¹ scFv. To calculate K_m values, A_{414} was monitored in a multiscan spectrophotometer at different ONPG concentrations. Values of ΔA_{414} s⁻¹ were converted into rate constants and K_m and V_{max} values were determined by using Sigma Plot Scientific Graphing Software. The first-order rate constant k_{cat} (turnover number) was calculated by dividing V_{max} by the total active enzyme concentration. Determinations were performed three times.

Results and discussion

Molecular cloning and production of a single-chain antibody against a major FMDV antigenic site

The molecular mechanisms of signal transduction of enzyme-based biosensors remain obscure although they represent efficient tools for molecular diagnosis. Protein M278VP1 is an hybrid β -galactosidase that displays an antigenic FMDV peptide accommodated between amino acids 279–280 of the enzyme, within

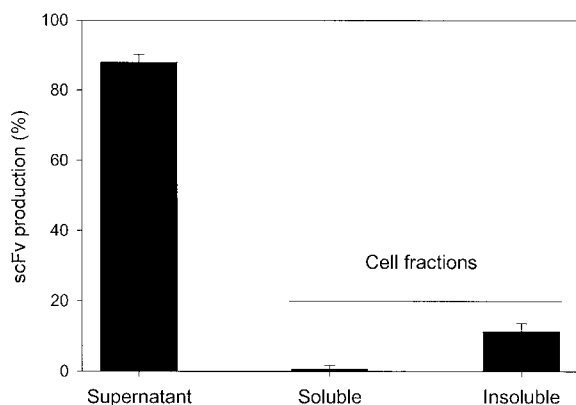


Fig. 2. Distribution of scFv93 production in supernatant and in soluble and insoluble HB2151 cell fractions. Values are given as the percentage of scFv present in each fraction relative to the total amount of produced recombinant protein. Bars represent the mean deviation of three different experiments.

the activating loop that is involved in the formation of the active site (Jacobson *et al.* 1994). Despite responding to anti-FMDV polyclonal sera and monoclonal antibodies (Benito *et al.* 1996, Feliu *et al.* 1998a), M278VP1 only exhibits a moderate activation mediated by Fab fragments of activating antibodies (Feliu *et al.* 1998, 2002). This fact suggests that at least in M278VP1, antibody-induced enzyme activation is strongly depending on bivalent antibody binding to two among the four FMDV peptide copies exposed on the enzyme surface.

To explore this possibility further, a single chain variable fragment (scFv) of mAb SD6 was cloned and produced in *E. coli* for testing its potential as sensor activator. From cultured SD6 hybridoma cell line, mRNAs were collected and cDNAs produced and cloned in a pCANTAB5E expression vector. Several bacterial clones efficiently producing E-tagged proteins and specifically recognising the GH23 peptide were obtained. However, in a small group of transformant colonies the specific peptide recognition by the produced scFv was not observed.

One clone from each group was sequenced on the two strands (Figure 1). Several amino acid substitutions were predicted in both proteins when comparing with the published SD6 sequence, but none of them affecting epitope-contact regions. Clone 73 efficiently directed the production of a scFv protein not reactive with peptide GH23. Interestingly, scFv73 showed a Pro₄₇→Ser substitution between two V_k domains and a Gly→Cys mutation in the linker region. In the first case, a direct impact of a proline substitution

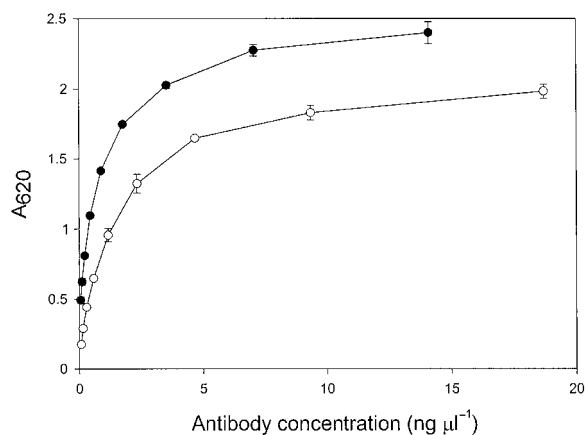


Fig. 3. Antigen binding of scFv93 (●) and mAb SD6 (○) to protein M278VP1 as determined by ELISA. At about 15 µg ml⁻¹, the reactivity signal of these antibody derivatives with the parental protein LACZ (without any foreign peptide) was 0.3 and 0.7 absorbance units respectively.

on the conformation of the carrying protein segment would be expected. Moreover, the Gly→Cys substitution, although not necessarily affecting the predicted secondary structure of the linker region shown to be critical for antigen recognition of scFv constructs (Huston *et al.* 1988, 1991), could interfere in the correct formation of disulphide bridges in the rest of the protein. Finally, it cannot be discarded that the Val₄₈→Ala substitution close to the V_H CDR2 could be also relevant, although mutations out from contact domains and the linker region seem to be not critical for immunoreactivity (Figure 1). It cannot be discarded that all or some of these mutations could have been introduced by PCR during the cloning process.

On the other hand, bacterial clone 93 producing scFv93, showed an intense reactivity with GH23 peptide in the colony lift assay (not shown) and it was selected for further experiments. Protein scFv93 was efficiently produced (at 1 µg ml⁻¹ of culture) and secreted in *E. coli* as a soluble and proteolytically stable polypeptide, only about 10% of the protein remaining associated to the producing cells as part of the insoluble fraction (Figure 2). No symptoms of toxicity were observed in the IPTG-treated, scFv-producing bacterial cultures (not shown).

Immunoreactivity of scFv93 and analysis of the sensor activation potential

Protein scFv93 specifically recognised FMDV GH23 peptide as presented on the surface of the hybrid M278VP1 β-galactosidase protein (Figure 3). The

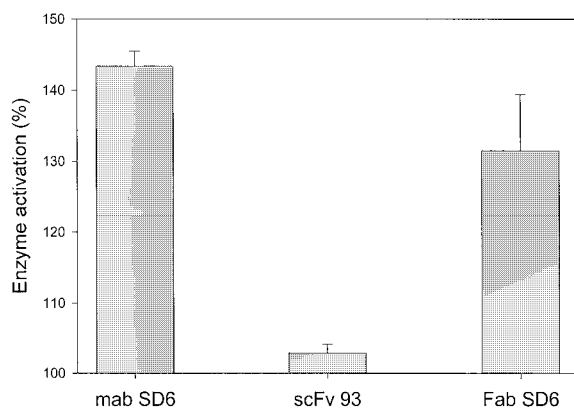


Fig. 4. Modulation of the enzymatic activity of protein M278VP1 incubated with $6.25 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ mAb SD6, $12.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ scFv93 or $4.17 \text{ ng}/\mu\text{l}^{-1}$ Fab SD6. Activation is shown as the enzyme activity in presence of each ligand relative to that observed without antibodies.

slight differences observed between scFv93 and the parental mAb SD6 in ELISA might be eventually due to a distinguishable affinity of both ligands. However, these differences were not observed when using other FMDV-based antigens such as the recombinant protein JX795A (Feliu & Villaverde 1998) and the synthetic GH23 peptide (not shown) and might eventually be due to the different secondary antibody used for detection. When testing the activating potential of scFv93 it was evidenced that this molecule was not able to modify the β -galactosidase specific activity. However, mAb SD6 clearly activate the enzyme, despite this antibody exhibits in general a low affinity for recombinant GH23 peptides (Carbonell *et al.* 1998). The Fab fragment was also able to promote activation although at a lower extent, but more efficiently, than the Fab of 3E5 antibody (Feliu *et al.* 1998a) while still recognising the GH23 segment (Carbonell *et al.* 1998).

The lack of activation induced by scFv93, compared with that of its Fab equivalent, suggested a different presentation of the epitope binding regions or an involvement of the Fab regions absent in scFv93, in enzyme activation. Also, it indicated that globally, these two molecules interact differently with the sensing peptide as displayed on the enzyme surface, resulting in a different signal transduction pattern.

Molecular co-operativity in β -galactosidase sensor activation

Results presented in Figure 4 prove a differential reactivity of the antigenic peptide and the epitope-

paratope interaction as mediated by either scFv93 or SD6 Fab, resulting in an undetectable sensor activation by scFv93. To explore if despite this distinguishable ligand sensor interaction, we used scFv93 as a competitor in SD6-mediated β -galactosidase activation. As a control, 4C4 Fab was also included. This anti-FMDV antibody, that has been also proved to activate hybrid FMDV- β -galactosidases, is targeted against a continuous B-cell epitope within the GH23 peptide but different from that recognised by SD6 (Verdaguer *et al.* 1999). As expected, high molar amounts of scFv93 inhibit the activation mediated by SD6 fragment but not that promoted by the 4C4 fragment (Figure 5), thus confirming the fine specificity of the scFv targeting. However, low molar amounts of the recombinant antibody segment were intriguingly enhancing the extent of enzyme activation as induced by both the homologous SD6 and the non-homologous 4C4 antibody fragments.

The co-operative effect was much more evident when combining SD6 scFv and 4C4 Fab than in the pair SD6 scFv and SD6 Fab. This fact seems to be caused by the lack of scFv-mediated inhibitory effects on the enzyme activation by 4C4, despite being less efficient than that promoted by SD6. In the case of SD6 Fab, it could generate antagonistic effects whose equilibrium is displaced according to the molar ratio between Fab and scFv in the reaction mixture. The mechanics of activation was explored in Fab 4C4 plus the recombinant scFv93. As previously described for the M278VP1 sensor (Feliu *et al.* 1998a), the enzymatic modulation was due also under these conditions to a reduction in the K_m of the enzyme (Table 1), indicating that the enzymatic activation mechanics upon the incubation with the monovalent molecular mixture is not essentially different from that induced by single bivalent antibody molecules.

On the other hand, the relative size of the enzyme and antibody ligands and the 14 nm^2 antibody fingerprint on the enzyme (Figure 6), actually allows multiple binding as deduced by the observed co-operativeness. The distinguishable impact that the independent binding of Fab and scFv has on the enzyme activity (Figure 4) shows that the molecular contacts on the enzyme surface are structurally different in these proteins. The enhanced activation promoted by the mixture (Figure 5) up to the most frequently observed values for enzyme responsiveness (Ferrer-Miralles *et al.* 2000), indicates a requirement of multiple but also heterogeneous contacts for enzyme activation that could force specific con-

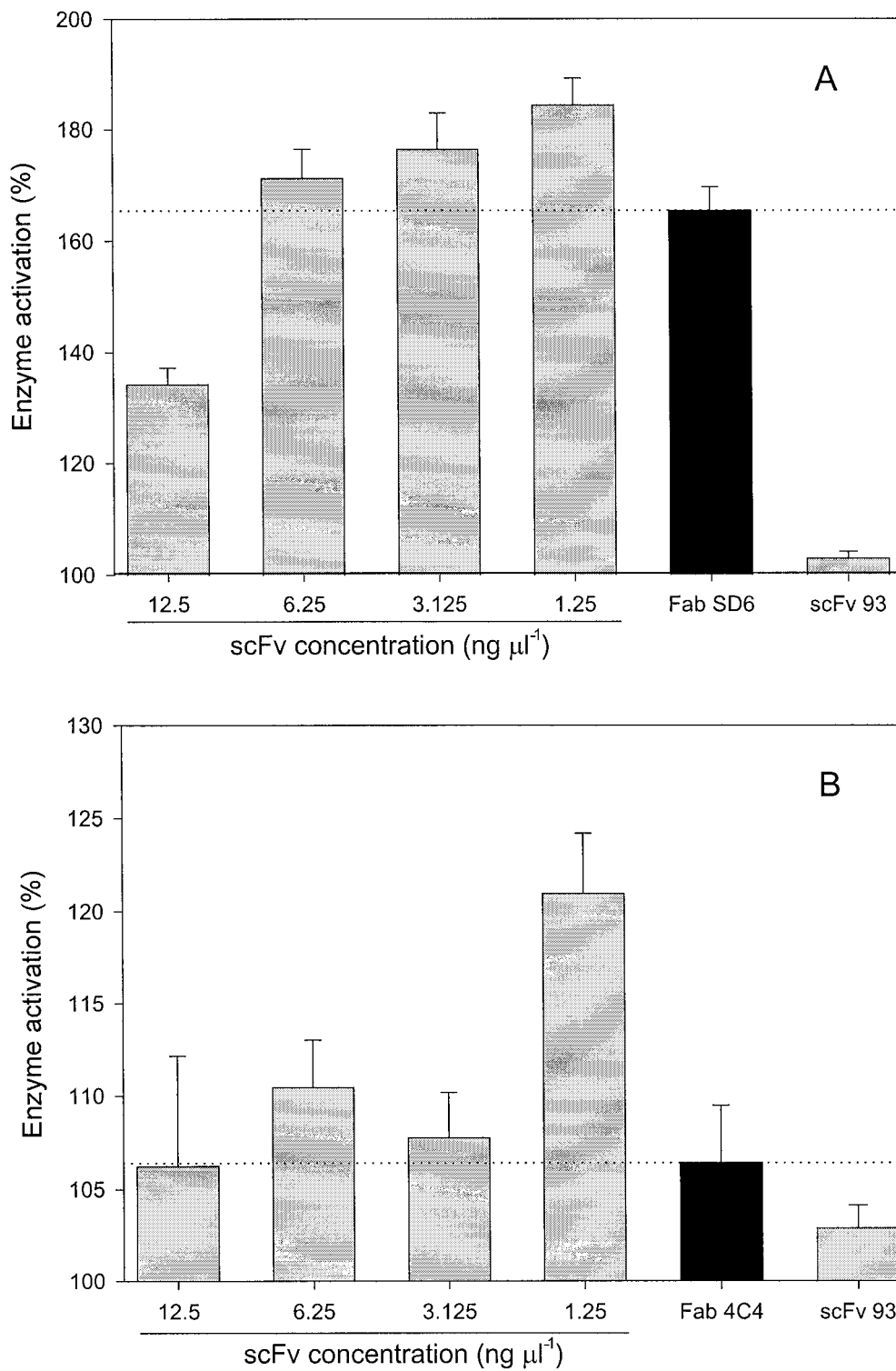


Fig. 5. Activation of protein M278VP1 in presence of Fab SD6 (A) or Fab 4C4 (B), with or without pre-incubation with different scFv93 amounts. When used alone, the concentration of Fab was $4.17 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ and that of scFv93 $2.5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ (for a better molar comparison of epitope-binding sites). The dotted lines indicate the basal activation factor mediated by Fab.

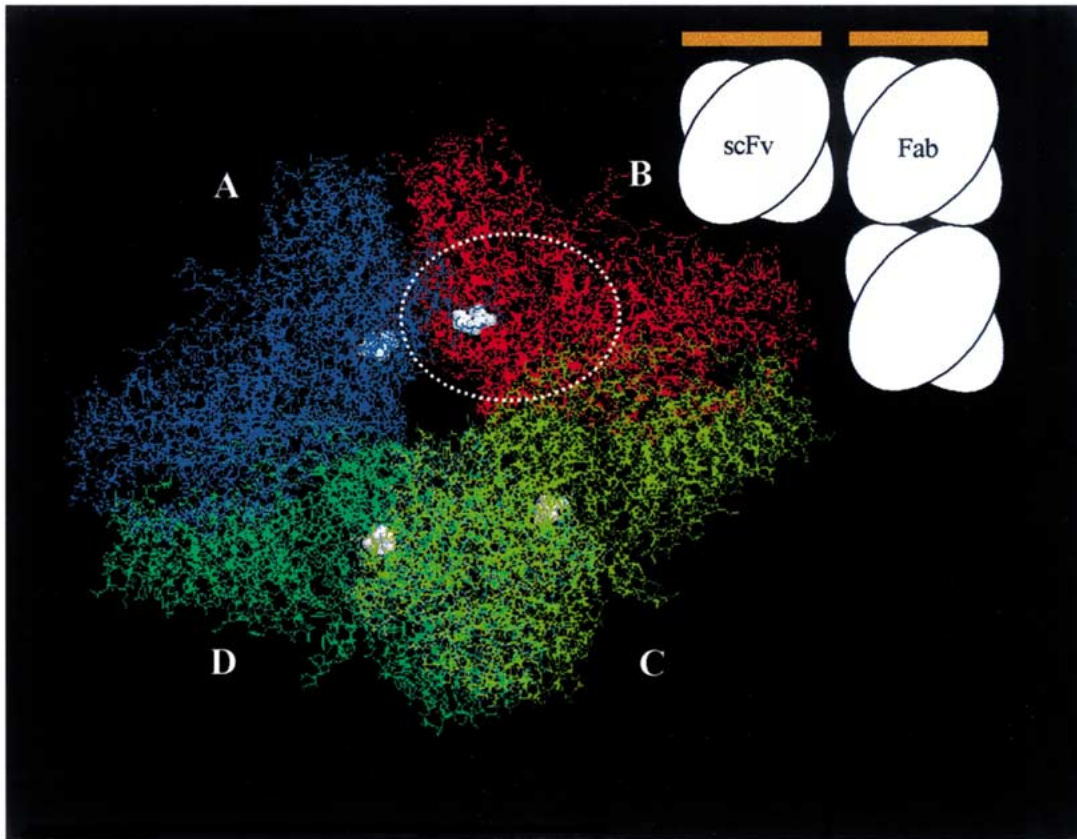


Fig. 6. A RasMol representation of *E. coli* β -galactosidase, in which the acceptor sites used to construct protein M278VP1 (amino acids 278 and 280) are indicated in white spheres. In this position, only those from monomers A (protruding on monomer B) and to a less extent C (protruding on monomer D) can be easily seen. The enzyme dimension along the longer two-fold axis is around 175 Å (Jacobson *et al.* 1994). Sized schemes of scFv and Fab polypeptides are also shown, indicating the epitope-binding region (bars at the top). An approximate, ellipsoid-shaped SD6 Fab fingerprint of 14 nm² is also shown on subunits A and B, according to the extent of SD6 Fab contact surface on a target peptide solved by X-ray crystallography (Verdaguer *et al.* 1996).

Table 1. Enzymatic constants of M278VP1 under different modulation conditions as indicated in Figure 5B.

	No antibody		mAb 4C4		Fab 4C4		scFv93		Fab 4C4+scFv93	
K_m (mM)	0.142±	0.017	0.110±	0.032	0.133±	0.020	0.149±	0.013	0.128±	0.020
K_{cat} (s ⁻¹)	1199	± 25	1224	± 57	1253	± 34	1319	± 21	1177	± 33
K_{cat}/K_m (mM s ⁻¹)	8438	±870	11107	±2945	9393	±1202	8852	±636	9224	±1240

formational modifications with long-distance effects. This is in agreement with the extreme sensitiveness of *E. coli* β -galactosidase activity to molecular contacts. Note that even non-hybrid enzymes respond to anti- β -galactosidase antibodies by modulation of their activity (Celada & Strom 1983), a fact that can only be explained by a combination of a critical conformational status of the active site, and long-distance conformational effects of the antibody bind-

ing (Celada & Strom 1972, Verdaguer *et al.* 1996). On the other hand, the activating loop of the enzyme, in which the heterologous peptide is accommodated in M278VP1, participates not only in the formation of the active site but also penetrates the partner monomer through the activating interface (Jacobson *et al.* 1994) (Figure 6). This deep structural connection between contact monomers could allow both the transmission of contact effects and the signal transduction in the

engineered enzymatic sensors by affecting the fine conformation of the activating interfaces. How such heterogeneous contacts could occur with whole IgG antibodies, while poor or null sensor response is observed separately with either Fab or scFv molecules (Figure 4) is still unclear. Irrespective of the precise mechanisms for molecular co-operativity the results obtained in this study clearly evidence that enzyme activation can occur through monovalent molecular contacts simultaneously occurring in multiple binding sites on the enzyme.

Acknowledgements

We are indebted to E. Brocchi, N. Verdager and E. Domingo for generously providing anti-FMDV antibodies and to F. García for helpful assistance in cell culture. This work has been supported by CI-CYT grant BIO2001-2443 and by Maria Francesca de Roviralta Foundation.

References

- Benito A, Feliu JX, Villaverde A (1996) Beta-galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **271**: 21251–21256.
- Brennan CA, Christianson K, La Fleur MA, Mandecki W (1995) A molecular sensor system based on genetically engineered alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5783–5787.
- Carbonell X, Feliu JX, Benito A, Villaverde A (1998) Display-induced antigenic variation in recombinant peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 773–777.
- Celada F, Strom R (1972) Antibody-induced conformational changes in proteins. *Quart Rev. Biophys.* **5**: 395–425.
- Celada F, Strom R (1983) β -Galactosidase: immune recognition of conformation and mechanism of antibody-induced catalytic activation. *Biopolymers* **22**: 465–473.
- Doi N, Yanagawa H (1999) Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution. *FEBS Lett.* **453**: 305–307.
- Feliu JX, Villaverde A (1998) Engineering of solvent-exposed loops in *Escherichia coli* β -galactosidase. *FEBS Lett.* **434**: 23–27.
- Feliu JX, Ramírez E, Villaverde A (1998a) Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in β -galactosidase molecular sensors. *FEBS Lett.* **438**: 267–271.
- Feliu JX, Cubarsi R, Villaverde A (1998b) Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 536–540.
- Feliu JX, Ferrer-Mirallès N, Blanco E, Cazorla D, Sobrino F, Villaverde A (2002) Enhanced response to antibody binding in engineered β -galactosidase enzymatic sensors. *Biochim. Biophys. Acta* **1596**: 212–224.
- Feliu JX, Ramírez E, Villaverde A (2000) Corrigendum to: Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in β -galactosidase molecular sensors. *FEBS Lett.* **473**: 123.
- Ferrer-Mirallès N, Feliu JX, Villaverde A (2000) Molecular mechanisms for antibody-mediated modulation of peptide-displaying enzyme sensors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 360–364.
- Ferrer-Mirallès N, Feliu JX, Vandevuer S, Müller A, Cabrera-Crespo J, Ortman I, Hoffmann F, Cazorla D, Rinas U, Prévost M, Villaverde A (2001) Engineering regulable *E. coli* β -galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera. *J. Biol. Chem.* **276**: 40087–40095.
- Hanahan D, Meselson M (1980) Plasmid screening at high colony density. *Gene* **10**: 63–67.
- Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai M-S, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R, Oppermann H (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 5879–5883.
- Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai M-S, McCartney J, Warren F, Haber E, Oppermann H (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Meth. Enzymol.* **203**: 46–88.
- Jacobson RH, Zhang XJ, DuBose RF, Matthews BW (1994) Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature* **369**: 761–766.
- Jiménez G, Correa I, Melgosa MP, Bullido MJ, Enjuanes L (1986) Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* **60**: 131–139.
- Kabat EA, Wu TT, Reid-Miller M, Perry HM, Gottesman KS (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th edn. Bethesda, USA: National Institutes of Health.
- Legendre D, Soumillon P, Fastrez J (1999) Engineering a regulatable enzyme for homogeneous immunoassays. *Nat. Biotechnol.* **17**: 67–72.
- Ramírez E, Más JM, Carbonell X, Avilés X, Villaverde A (1999) Detection of molecular interactions by using a new peptide-displaying bacteriophage biosensor. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **262**: 801–805.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Verdaguer N, Mateu MG, Bravo J, Domingo E, Fita I (1996) Induced pocket to accommodate the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in a neutralizing antibody against foot-and-mouth-disease virus. *J. Mol. Biol.* **256**: 364–376.
- Verdaguer N, Schoehn G, Ochoa WF, Fita I, Brookes S, King A, Domingo E, Mateu MG, Stuart D, Hewat EA (1999) Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. *Virology* **255**: 260–268.

4.3 Artículo III

Engineering of *Escherichia coli* β -galactosidase for solvent-display of a functional scFv antibody fragment

P. Alcalá, N. Ferrer-Miralles and A. Villaverde

FEBS Letters en prensa

RESUMEN

La ingeniería de proteínas permite el diseño modular de polipéptidos para generar híbridos que contengan dominios funcionales de diferentes orígenes, que a su vez, se puedan combinar de forma que las proteínas creadas exhiban nuevas propiedades biológicas. En este trabajo hemos evaluado diferentes sitios tolerantes del enzima β -galactosidasa para generar enzimas híbridos funcionales que presentaran el fragmento recombinante (scFv) del anticuerpo monoclonal SD6. La caracterización de las proteínas híbridas obtenidas indicó que al fusionar dicho fragmento al extremo amino-terminal del enzima, la proteína era estable, mantenía su actividad específica e interactuaba con el antígeno hacia el cual estaba dirigido el fragmento de anticuerpo fusionado. Además la quimera scFv-enzima era activa aún cuando se encontraba unida al antígeno y por lo tanto, se demostró su utilidad como reactivo en ELISA. Los resultados obtenidos se discuten dentro del contexto de la flexibilidad que presenta la β -galactosidasa como portadora de dominios funcionales de gran tamaño con propiedades de unión, y conducen a investigar la aplicabilidad del principio scFv-enzima para el diagnóstico u otras aplicaciones biomédicas que involucren la detección de antígenos.

Mensaje original-----

De: Julio E. Celis [mailto:jec@cancer.dk]

Enviado el: miércoles, 30 de octubre de 2002 18:20

Para: Antoni.Villaverde@uab.es

CC: FEBS.Letters@embl-heidelberg.de

Asunto: F02-1920, JEC 4925

Dear Dr. Villaverde:

I am happy to inform you that your article (JEC 4925) has been accepted for publication in FEBS Letters. I would appreciate very much if you could send me the original article (hard copy) together with reproduction quality figures as soon as possible. Also, I will need a diskette. PDF files are not suitable for publication.

My new address is Institute of Cancer Biology, The Danish Cancer Society, Strandboulevarden 49, DK-2100, Copenhagen, Denmark.

Sincerely Yours

Julio E. Celis
Editor

Engineering of *Escherichia coli* β -galactosidase for solvent-display of a functional scFv antibody fragment

Pilar Alcalá, Neus Ferrer-Miralles¹, Antonio Villaverde^{*}

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina and Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Present address: ¹ Microbiology Unit. Universitat Pompeu Fabra. Doctor Aiguader 80, 08003 Barcelona

^{*}Corresponding author: Phone: (34) 935812148; Fax: (34) 935812011; E-mail: avillaverde@servet.uab.es

Key words: Antigen; β -galactosidase; Protein engineering; Recombinant antibody; Single-chain Fv

Abstract

Protein engineering allows the generation of hybrid polypeptides with functional domains from different origins and therefore exhibiting new biological properties. We have explored several permissive sites in *Escherichia coli* β -galactosidase to generate functional, hybrid enzymes displaying a mouse scFv antibody fragment. When such segment was placed at the amino terminus of the enzyme, the whole fusion protein resulted stable, maintained its specific activity and interacted specifically with the target antigen, a main antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus. In addition, the antigen-targeted enzyme was enzymatically active when bound to the antigen and therefore useful as a reagent in single-step immunoassays. These results prove the flexibility of *E. coli* β -galactosidase as a carrier for large-sized functional domains with binding properties and prompt to further explore the biotechnological applicability of the scFv-enzyme targeting principle for diagnosis or other biomedical applications involving antigen tagging.

1. Introduction

Protein engineering allows a modular design of non-natural polypeptides, in which different functions associated to independent domains from different origins can be combined in a desirable way to serve specific purposes. Examples of such multifunctional hybrid proteins include vehicles for delivery of targeted DNA [1] or functional enzymes [2] and molecular sensors [3]. The *Escherichia coli* β -galactosidase is a homotetrameric enzyme [4] widely spread employed as a convenient tool in molecular and cell biology. Its tolerance to both terminal fusions [5] and inner peptide insertions [6] have prompted its use as carrier to stabilize recombinant proteins [7], as a purification tag [8] and as a reporter for analysis of gene expression through gene fusions [9]. The availability of different substrates rendering coloured, fluorescent or luminescent components enhances the versatility of this enzyme for fine analytic determinations, simple ELISA tests or *in situ* determinations of gene expression. In this work, we have explored several tolerant sites of this enzyme, previously identified by insertional mutagenesis and gene fusion [6, 10], to display a functional, single chain antibody fragment keeping both the enzymatic activity and the antigen-binding properties. The feasibility of this approach would allow the use of such hybrid enzyme for the tagging of specific antigens and among other possibilities, its application as single molecule-reagent in conventional ELISA. The obtained results indicate that the amino-terminus of this enzyme is capable to accept an antiviral scFv antibody and that the hybrid protein is produced in *E. coli* at an important yield. The antibody-enzyme chimera specifically recognized the antigen against which the parental antibody was elicited and it was enzymatically active while bound to the antigen.

2. Material and methods

2.1 Bacterial strains, plasmids, and cloning strategy

The *E. coli* K12 strain MC1061 ((F⁻, λ⁻), Δ(*araA-leu*)7697, Δ(*cod-lacI*)3, *araD*139, *gal*E15, *galK*16, *hsdR*2, *mcrA*, *mcrB*, *relA*1, *rpsL*150 (strR), *spoT*1) was used for cloning purposes. Fusion proteins were produced in the protease-deficient *E. coli* strain BL26, a Lac⁻ derivative of BL21 (*dcm*, *hsdS*, *gal*, Lon⁻, OmpT⁻) [11]. All the recombinant vectors constructed in this work derive from pJLACZ [12], encoding a pseudo-wild type *E. coli* β-galactosidase enzyme whose production is driven by both λ *p_L* and *p_R* promoters placed in tandem and controlled by the thermo labile cl857 repressor, encoded by the same vector.

Plasmids pPA278SD6, pPANlacZSD6 and pPALacZCSD6 were constructed to present the scFv93 protein inserted between residues 279-280 (in the activating interface of the enzyme) or fused to either the amino or carboxy termini of β-galactosidase respectively (Figure 1). scFv93 is a recombinant version of the SD6 antibody, that binds specifically to a main B-cell epitope from foot-and-mouth disease virus (FMDV) from serotype C₁, sited in the VP1 capsid protein [13]. The scFv93-encoding DNA was generated by PCR amplification (driven by the proofreading Deep Vent® DNA polymerase) from plasmid pCASD6 93 [14], using two alternative pairs of complementary oligonucleotides. The pair CSD6S (5'-GGG ATC CCA GGT GAA ACT GCA GC-3') and CSD6R (5'-GGG ATC CCC GTT TTA TTT CCA GC-3'), was used to obtain a product for ligation into the *Eco*RI digested vector pJLACZ, resulting in vector pPALacZCSD6. The pair NSD6S (5'-GGA TCC CAG GTG AAA CTG CAG C-3') and NSD6R (5'-GGG GAT CCC CGT TTT ATT TCC AGC-3'), was used to obtain a product for ligation into the *Nco*I digested vector pJLACZ, resulting in vector pPANlacZSD6. For cloning at position 279-280, the product from amplification with the NSD6S-NSD6R pair was digested with *Bam*HI and repaired with Klenow enzyme. Then, the DNA segment was ligated into the *Cl*I-digested vector pJLACZ, also repaired with Klenow enzyme, resulting in the vector pPA278SD6.

2.2 Cultures, protein production and enzymatic assays

Plasmid-containing cell cultures were grown at 28°C and 250 rpm in 200 ml of Luria-Bertani (LB) medium [15] plus 100 µg/ml ampicillin until they reached an OD₅₅₀ 0.3, and then were transferred to a water bath warmed at 42°C, where the recombinant gene expression was allowed for 3 h at 250 rpm. β-Galactosidase activity of bacterial cultures was assayed as described [16] in samples of 0.1 ml plus 0.9 ml of Z buffer (0.06M Na₂HPO₄, 0.04M NaH₂PO₄, 0.01M KCl, 1mM MgSO₄, pH 7) at 28°C. The reaction was initiated with 200 µl of 4 mg/ml ortho-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG) in phosphate buffer [16], and when the yellow colour was evident it was stopped with 500 µl of 1M Na₂CO₃. The absorbance of the samples was read at 414 nm in a Labsystems iEMS Reader MF.

2.2 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Producing bacterial cells were harvested and concentrated (40x) by low-speed centrifugation and pellets were resuspended in 3 ml of TM buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.2) supplemented with one protease inhibitor cocktail tablet (Roche) per 7 ml of TM buffer. When necessary, soluble and insoluble cell fractions were separated by centrifugation at 16,000 g and 4°C for 10 min, and boiled separately in Laemmli buffer [17], loaded on 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and blotted onto nitrocellulose sheets. Proteins were immunodetected with anti-β-galactosidase rabbit serum (1/500) obtained against the commercial enzyme. Anti-rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase were obtained from BioRad and used at 1/2000. Bands were developed with H₂O₂ and 4-chloro-1-naphthol as a substrate. Blot images were obtained in a Hewlett-Packard high-resolution scanner and relevant bands were quantified by using Quantity One software from Bio-Rad. Specific activity of soluble PANlacZSD6 was calculated from the enzymatic activity and the fusion protein amount in cell extracts, two hours after induction of gene expression.

2.3 Peptides and ELISA

The 21-mer linear peptide A21 (YTASARGDLAHLTTTHARHLP), reproduces a segment of the G-H loop from FMDV VP1 protein, the antigenic site A, that includes the antibody SD6 B-cell epitope [13]. The 13-mer-control peptide P2 (CSGKLICTTAVPW)

reproduces an immune relevant B-cell epitope from gp41 of HIV [18]. Binding of PANIacZSD6 to peptides was tested in solid phase by sandwich ELISA as follows. Different amounts of peptide A21 or the control peptide P2 from HIV ranging from 0.08 to 100 pmols were incubated overnight at 4°C as coating antigens in microtiter plates. After washing, wells were blocked overnight at 4°C with 300 µl of blocking buffer (5% non-fat dry milk in phosphate-buffered saline containing one protease inhibitor cocktail tablet per 7 ml of buffer). Plates were washed and incubated overnight at 4°C with 100 µl of a 1:1 mixture of blocking buffer and 40x-concentrated soluble fraction of BL26/PANIacZSD6 cells, obtained 2 h after induction of gene expression. After washing, rabbit anti-β-galactosidase sera diluted 1/1000 was added and after an overnight incubation at 4°C, plates were washed and further incubated with a solution of goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (BioRad) under the same conditions. After extensive washing, peroxidase reaction was done by adding a standard solution of H₂O₂, 3-dimethylaminobenzoic acid and 3-methyl-2-benzothiazolinone as substrates (Sigma). The reaction was stopped with 2M H₂SO₄ and the resulting blue colour was read at 620 nm. Monoclonal antibody SD6 at 18.7 ng/µl and protein LACZ in cell extracts prepared as for PANIacZSD6 were used as positive and negative controls respectively for binding to peptide A21. SD6 was detected with a goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (BioRad).

For the ELISA revealed through the β-galactosidase activity of PANIacZSD6, microtiter plates were incubated overnight at 4°C with peptides A21 or P2 and washing and blocking steps were performed as described above. The incubation with the recombinant protein was done overnight at 4°C. Plates were washed and bound protein was detected by using 4 mg/ml ONPG in Z buffer. The reaction was stopped with 1M Na₂CO₃ after 2 h incubation at 28°C and the absorbance was read at 414 nm in a Labsystems iEMS Reader MF. All the ELISA tests were done in triplicate.

3. Results

3.1 Bacterial production of scFv- β -galactosidase fusion proteins

After construction and checking, plasmids pPA278SD6, pPANlacZSD6 and pPALacZCSD6 were transformed into *E. coli* BL26. Recombinant cells were grown in LB medium without any symptom of toxicity, reaching the same biomass than the control BL26/pJLACZ cultures (not shown). Three hours after the temperature shift, the enzymatic activities were $14,354.2 \pm 1,191.1$, $9,477.1 \pm 813.7$ and $5,439.6 \pm 124.8$ U/ml for pJLACZ-, pPALacZCSD6- and pPANlacZSD6-bearing cultures respectively, but it was undetectable in BL26/pPA278SD6 cells. These data suggested differential proteolysis of the fusions, which was confirmed by SDS-PAGE and further Western blot analysis of cell extracts. The full-length form of pPANlacZSD6 was clearly observed, representing between 25 and 30 % of the total anti- β -galactosidase immunoreactive protein, being mainly a 90 kDa degradation fragment (Figure 2). Traces of a β -galactosidase-like fragment were also visualised. However, no intact forms of PA278SD6 and PALacZCSD6 were detected at any post-induction time, these proteins occurring only as degradation fragments (not shown). The enzymatic activity associated to PALacZCSD6 production must then be essentially due to enzymatically active degradation fragments.

Therefore, only the amino terminal fusion PANlacZSD6 was further characterized regarding both productivity and functionality. After cell fractioning, about 90 % of PANlacZSD6 was found in the soluble cell fraction while the rest remained associated to the insoluble cell material. The specific activity was calculated to be $2,223.48 \pm 92.76$ U/ μ g, similar to that of previously reported ($2,765 \pm 347$ U/ μ g) for the parental, pseudo wild type β -galactosidase LACZ [6]. Two hours after induction of gene expression, the productivity in shaker flasks of the soluble, full-length form of PANlacZSD6 was found to be 1.1 μ g/ml culture.

3.2 Specific binding and enzymatic activity of PANlacZSD6

To evaluate the proper solvent exposure and binding specificity of the scFv domain as displayed on the surface of PANlacZSD6, a capture ELISA was performed with the A21

SD6 epitope peptide and the SD6-irrelevant, P2 peptide as bound antigens. As shown in Figure 3, PANlacZSD6 but not the parental LACZ protein was retained by A21 (but not by P2), as determined by an anti- β -galactosidase antibody. This fact, proved the correct presentation and binding specificity of the recombinant, fusion version of SD6. To evaluate if in the bound state PANlacZSD6 was able to retain its enzymatic activity, an additional capture ELISA was performed in which the binding of the fusion was monitored by its enzymatic activity. In Figure 4 it is shown the increase of β -galactosidase activity retained by growing amounts of A21, demonstrating that the fusion protein is active even when interacting to the antigen through its amino-terminal scFv domain. This result indicates that scFv- β -galactosidase fusions are appropriate tools for molecular targeting and confirms the plasticity of this enzyme for diverse biotechnological purposes.

4. Discussion

Being an enormous tetrameric enzyme, the tolerance of *E. coli* β -galactosidase to both end-terminal protein fusions and inner peptide insertions is remarkable [5, 6]. In previous works, we had inserted up to 45-mer peptides in the close vicinity of the active site, maintaining the enzymatic activity of the hybrid proteins [6, 10, 19]. In most of the identified permissive sites the foreign peptide was solvent-exposed, antigenic and available for ligand-receptor interactions [20, 21]. However, the proteolytic stability of some of these constructs was seriously impaired by the foreign stretch [19]. On the other hand, an extensive degradation was also observed in a carboxy-terminal fusion (being the equivalent amino-terminal version much more stable) carrying a 23 kDa heterologous protein [22]. In this work we have tried three acceptor sites of the enzyme (namely the two terminal ends and an inner permissive site), for the solvent-display of an scFv to construct an antigen-targeted recombinant enzyme (Figure 1). Among them, only the amino terminus of β -galactosidase tolerated the engineered protein domain of 247 aa reproducing the paratope of the monoclonal antibody SD6. Although partial degradation of this protein (named PANlacZSD6) was also detected (Figure 2), around 30 % of the β -galactosidase immunoreactive material occurred in its full-length form. Also, it was mainly produced as a soluble protein and at reasonably high yields, without significant reduction of specific activity when compared with the parental LACZ protein. Therefore, these results support a high tolerance of the β -galactosidase amino terminus versus the sensitivity of the carboxy terminus, and prompt to further discard the position 279-280 (being permissive to short peptides), to accommodate large protein domains.

On the other hand, protein PANlacZSD6 recognises specifically the SD6 target antigen (Figure 3) and maintains its enzymatic activity in the bound state (Figure 4). This is especially important because the activity of *E. coli* β -galactosidase can be affected by the binding of antibodies directed against either enzyme epitopes [23] or inserted antigenic peptides [19, 24]. In addition, the dual activity of PANlacZSD6 (namely antigen binding and catalytic properties) can be extremely useful in the biomedical context for tagging specific antigens. An immediate example is the application of this principle in diagnostic immunoassays through the use of single chain enzymatic antibodies produced in recombinant organisms. However, the spectrum of possibilities for such an enzyme-antibody fusion protein could also eventually embrace therapeutic purposes.

End-terminal fusions between alkaline phosphatase and antibody fragments have been previously reported for antigen targeting and to circumvent the use of a second, conjugated antibody in ELISA [25, 26,27]. However, *E. coli* β -galactosidase possesses a wider substrate spectrum of substrates including ONPG, chlorophenolred- β -D-galactopyranoside (CPRG), 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal), Galacton®, fluorescein di-beta-D-galactopyranoside (FDG), phenylethyl beta-D-thiogalactopyranoside (PETG) and beta-methylumbelliferyl beta-D-galactopyranoside (MUG), that rendering either coloured, fluorescent or luminescent products allows different analytical strategies. In addition, the easiness of its single-step purification chromatography [28] and the permissivity of this enzyme to multiple peptide insertions [29, 30], would allow not only a fast, sensitive and flexible enzymatic determination in automated systems but also its further engineering and bioproduction to display additional protein domains for a new combination of desired functions.

AcknowledgmentsThis work has been supported by CICYT (grant BIO2001-2443) and by Maria Francesca de Roviralta Foundation, Spain.

References

- [1] Fominaya, J., and Wels, W. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10560-10568.
- [2] Villaverde, A., Feliu, J.X., Arís, A., Harbottle, R., Benito, A. and Coutelle, C.A. (1998) *Biotechnol. Bioeng.* 59, 249-301.
- [3] Doi, N. and Yanagawa, H. (1999) *FEBS Lett.* 457, 1-4.
- [4] Jacobson, R.H., Zhang, X-J., DuBose, R.F. and Matthews, B.W. (1994) *Nature* 369, 761-766.
- [5] Ullmann, A. (1992) *BioEssays* 14, 201-205.
- [6] Feliu, J.X. and Villaverde, A. (1998) *FEBS Lett.* 434, 23-27.
- [7] Hellebust, H., Murby, M., Abrahamsen, L., Uhlén, M. and Enfors, S.-O. (1989) *Bio/Technology* 7, 761-766.
- [8] Ullmann, A. (1984) *Gene* 29, 27-31.
- [9] Casadaban, M.J., Martínez-Arias, A., Saphira, S.K. and Chou, J. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 293-300.
- [10] Benito, A., Mateu, M.G. and Villaverde, A. (1995) *Bio/Technology* 13, 801-804.
- [11] Studier, F.W. and Moffat, B.A. (1986) *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- [12] Benito, A., Vidal, M. and Villaverde, A. (1993) *J. Biotechnol.* 29, 299-306.
- [13] Mateu, M.G., Martínez, M.A., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F. and Domingo, E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5883-5887.
- [14] Alcalá, P., Ferrer-Miralles, N., Feliu, J.X. and Villaverde, A. (2002) *Biotechnol. Lett.* 24, 1543-1551.
- [15] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1985) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [16] Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [17] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- [18] Stigler, R.D., Ruker, F., Katinger, D., Elliott, G., Hohne, W., Henklein, P., Ho, J.X., Keeling, K., Carter, D.C. and Nugel, E. (1995) *Protein. Eng.* 8, 471-479.
- [19] Ferrer-Miralles, N., Feliu J.X, Vandevuer, S, Müller, A., Cabrera-Crespo, J., Ortmans, I., Hoffmann, F., Cazorla, D., Rinas, U., Prévost, M. and Villaverde, A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40087-40095.
- [20] Carbonell, X., Feliu, J.X., Benito, A. and Villaverde, A. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 773-777.
- [21] Feliu, J.X., Benito, A., Oliva, B., Avilés, X., and Villaverde, A. (1998) *J. Mol. Biol.* 283, 331-338.
- [22] Corchero, J.L. and Villaverde, A. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* 64, 644-649.
- [23] Celada, F. and Strom, R. (1972) *Q. Rev. Biophys.* 5, 395-425.
- [24] Benito, A., Feliu, L.X. and Villaverde, A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 21251-21256.

[25] Wels, W., Harwerth, I., Zwickl, M., Hardman, N., Groner, B. and Hynes, N.E. (1992) *Bio/Technology* 10, 1128-1132.

[26] Griep, R.A., van Twisk, C., Kerschbaumer, R.J., Harper, K., Torrance, L, Himmler, G., van der Wolf, J.M. and Schots, A. (1999) *Protein Expr. Purif.* 16, 63-69.

[27] Rau, D., Kramer, K. and Hock, B.J. (2002) *Immunoassay Immunochem.* 23, 129-143.

[28] Ullmann, A. (1984) *Gene* 29, 27-31.

[29] Arís, A. and Villaverde, A. 2000. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 455-461.

[30] Cazorla, D., Feliu, J.X. and Villaverde, A. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 72, 255-260.

[31] Kalnins, A. Otto, K. Ruther, U. and Müller-Hill, B. (1983) *EMBO J.* 2, 593-597.

Legends for figures

Figure 1. Schematic representation of the engineered β -galactosidase proteins, indicating the location of the scFv93 insertion in the primary sequence of each construct (black boxes). The inserted segment is 247 amino acids in length. The CDRs are indicated in bold and the linker in italics and underlined. The numbering of the heavy and light chains is according to the sequence of the parental mAb SD6 [13]. The amino acid residues of β -galactosidase, flanking the heterologous stretches, are also indicated by asterisks. The corresponding numbering is according to Fowler and Zabin [31].

Figure 2. Western blot analysis of soluble PANlacZSD6 produced in *E. coli* BL26, 2 hours after induction of gene expression. The upper band at the right lane corresponds to the full-length PANlacZSD6 (146 kDa). β -galactosidase markers ranging from 500 ng to 125 ng were loaded in the left lanes. Lane MW indicates molecular weight markers whose apparent masses are indicated by arrows.

Figure 3. Binding of protein PANlacZSD6 to peptides A21 (black triangles) and P2 (white triangles) as measured by an anti- β -galactosidase monoclonal antibody. The union of the monoclonal antibody SD6 to A21 (black circles) and P2 (white circles) is also presented. Note that the absolute absorbance values of PANlacZSD6 and SD6 are not comparable as the second antibody is different in both cases. The background binding of LACZ protein to peptide A21 (black squares) and peptide P2 (white squares) is also shown as a control.

Figure 4. Binding of protein PANlacZSD6 to peptides A21 (white circles) and P2 (black circles) as measured by the PANlacZSD6 β -galactosidase activity.

Figure 1. Alcalá et al.

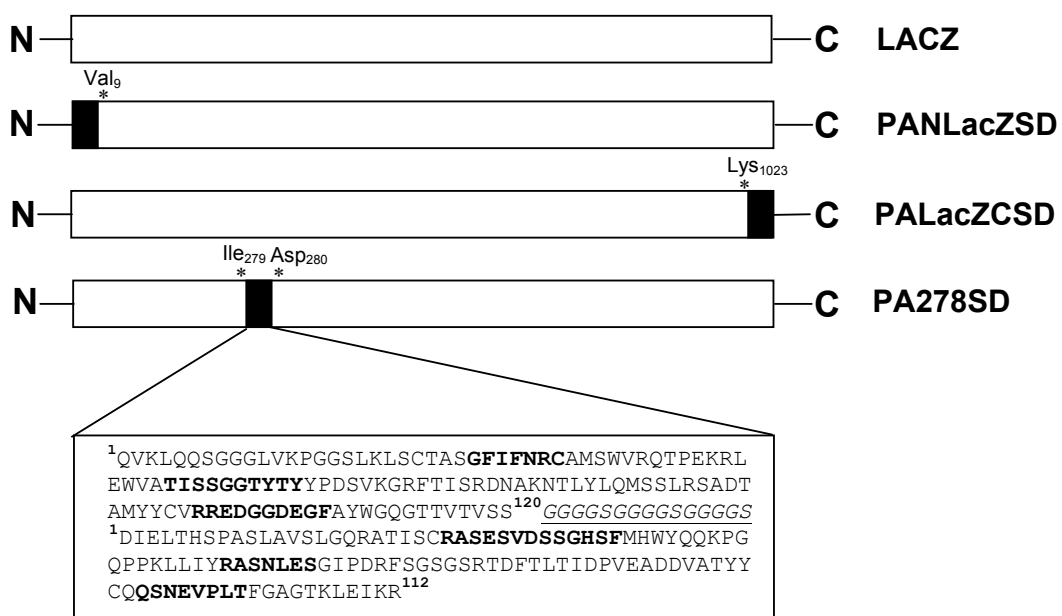


Figure 2. Alcalá et al.

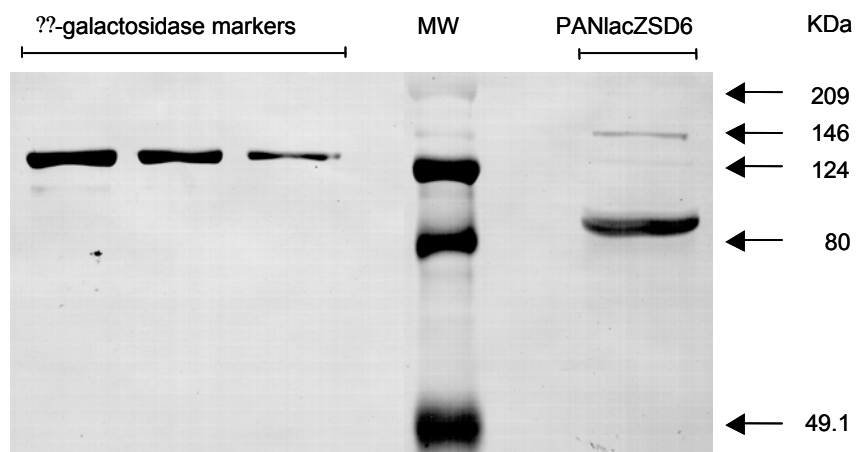


Figure 3. Alcalá et al.

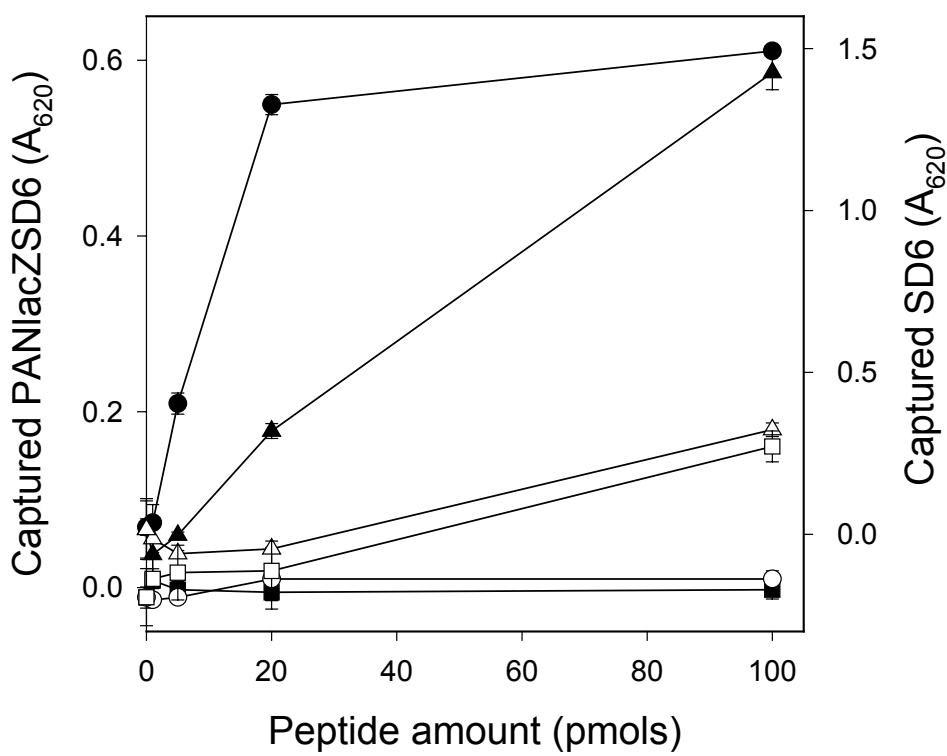
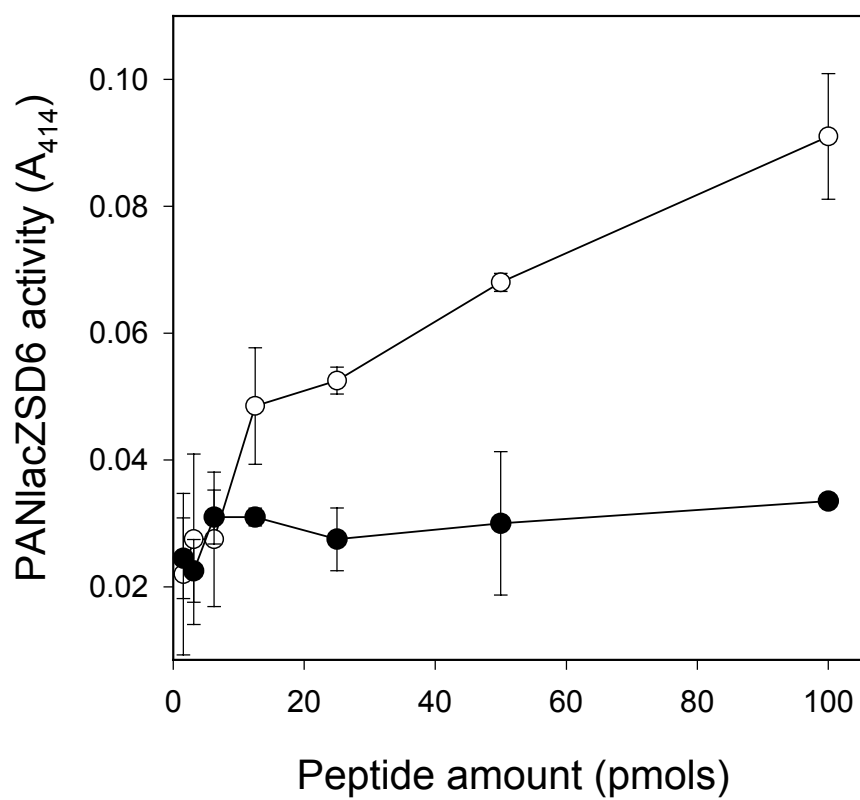


Figure 4. Alcalá et al.



5. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Interacción molecular entre β -galactosidasas recombinantes que exponen el péptido RGD del virus de la fiebre aftosa y sus receptores en la superficie celular

En la última década se han construido diferentes biosensores enzimáticos para detectar analitos (Brennan *et al.*, 1995; Benito *et al.*, 1996; Miyawaki *et al.*, 1997; Hellinga y Marvin, 1998; Legendre *et al.*, 1999). Entre otros enzimas que se han utilizado para este propósito se encuentra la β -galactosidasa de *Escherichia coli*, que en nuestro laboratorio se ha modificado para presentar péptidos antigénicos víricos en su superficie (Benito y Villaverde, 1994; Benito *et al.*, 1995; Feliu y Villaverde, 1998; Feliu *et al.*, 2000a; Ferrer-Miralles *et al.*, 2001). Este enzima ha demostrado tener una gran utilidad para la detección de anticuerpos específicos anti-péptido debido al incremento en su actividad enzimática, que además puede ser detectada fácilmente por medio de un ensayo colorimétrico (Benito *et al.*, 1996; Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b).

Aún no se conoce el mecanismo molecular de la activación en biosensores enzimáticos y hasta el momento las únicas moléculas que se han descrito como posibles reguladores de dicha actividad son anticuerpos (Brennan *et al.*, 1995; Benito *et al.*, 1996; Legendre *et al.*, 1999) y en un solo caso inhibidores enzimáticos (Doi y Yanagawa, 1999). Por lo tanto, la mayoría de estudios tendientes a determinar la base molecular de la reactivación se han llevado a cabo utilizando anticuerpos como ligandos. En primeras aproximaciones en las cuales se han analizado las constantes enzimáticas de los sensores basados en β -galactosidasas se ha sugerido que la unión del anticuerpo puede inducir cambios conformacionales del antígeno lo cual puede producir a su vez cambios conformacionales locales en el sitio activo que conduzcan a un aumento en la k_{cat} o una disminución en la K_m . Por otro lado, otros resultados sugieren que la unión bivalente por parte del ligando a más de un monómero podría ser necesaria para la activación de la β -galactosidasa (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b). Todo esto parece indicar que los anticuerpos pueden ser ligandos especialmente buenos activando biosensores enzimáticos multiméricos a través de efectos conformacionales o estabilizantes no locales y que involucren a más de un monómero.

En trabajos anteriores se han generado una serie de β -galactosidasas recombinantes que llevan insertado un péptido del virus de la fiebre aftosa que contiene el motivo RGD, el cual está involucrado en la unión a células por medio de la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Berinstein *et al.*, 1995). Una de estas proteínas, la M278VP1 que lleva la inserción en la posición 279-280, cerca del sitio activo (Jacobson *et al.*, 1994), ha sido estudiada ampliamente y es uno de los modelos de sensor molecular para la detección cuantitativa de anticuerpos específicos (Benito *et al.*, 1996). Estudios previos indicaban que la unión de suero o anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido insertado daban como resultado una recuperación parcial de la actividad enzimática que se había perdido tras la inserción del péptido (Benito y Villaverde, 1994; Benito *et al.*, 1995). Por otra parte, en ensayos posteriores se pudo determinar que se requería una interacción bivalente del anticuerpo monoclonal para su activación (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b).

Sin embargo, la completa comprensión de los mecanismos de la reactivación enzimática requiere un análisis más detallado, especialmente si se piensa en su eventual adaptación a la detección de ligandos monovalentes, como antígenos. Por lo tanto nos propusimos estudiar más a fondo las interacciones de las β -galactosidasas recombinantes para determinar por un lado si estas enzimas podían detectar ligandos diferentes a los anticuerpos y por otro, para conocer más detalles de los mecanismos moleculares de la activación enzimática y eventualmente determinar si hacen falta modificaciones no locales para que se produzca este efecto. Con este fin, seleccionamos integrinas que interaccionan con el mismo péptido sensor y a través del mismo sitio (Verdaguer *et al.*, 1995; Verdaguer *et al.*, 1998) y que se han descrito como receptores naturales del virus, y evaluamos el impacto que dicha unión tenía sobre la actividad enzimática en comparación con lo que se observaba para un anticuerpo monoclonal. Las integrinas utilizadas fueron la $\alpha_v\beta_3$, uno de los receptores de la vitronectina (Felding-Habermann y Cheresch, 1993) y que se considera el principal receptor del virus (Berinstein *et al.*, 1995; Villaverde *et al.*, 1996; Jackson *et al.*, 1997; Neff *et al.*, 1998) y la $\alpha_5\beta_1$ que se ha identificado como uno de los receptores de la fibronectina (Pytela *et al.*, 1985; Tamkun *et al.*, 1986; Argraves *et al.*, 1987) y que podría ser un sitio secundario de unión del virus a las células (Chambers *et al.*, 1996; Villaverde *et al.*, 1996). Las dos proteínas son heterodímeros que presentan tan solo un sitio de unión al motivo RGD. En ninguno de los casos se observó una modificación de la actividad enzimática ni siquiera cuando se añadieron cationes divalentes (Artículo 1, figuras 4A y 4B), que son indispensables para una eficiente unión

de las integrinas (Hynes *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Mould *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998) y que posiblemente actúan regulando la afinidad y especificidad de la unión a ligandos modificando la estructura del sitio de unión (Dransfield *et al.*, 1992a; Dransfield *et al.*, 1992b).

Llevamos a cabo un ensayo para comprobar que el resultado anterior no se debía a que el patrón de unión que se da en el caso de las integrinas solubles fuese diferente al que se produce cuando están expuestas en la superficie celular. Para realizarlo utilizamos la línea celular BHK₂₁ que es utilizada para la multiplicación del virus en el laboratorio y a partir de la cual se han hecho varios ensayos con anticuerpos dirigidos contra el receptor de la vitronectina (integrina $\alpha_v\beta_3$), que han permitido proponer que la unión del virus a estas células se realiza a través de dicha proteína (Berinstein *et al.*, 1995). Este ensayo lo realizamos a 4°C ya que se sabe que a esta temperatura los ligandos se unen a las integrinas pero no se internalizan (Wickham *et al.*, 1993; Villaverde *et al.*, 1998). Los resultados demostraron que no había reactivación enzimática mientras que con el anticuerpo monoclonal 3E5 la modulación era evidente (Artículo 1, figuras 5A y 5B).

Una posible explicación a estos resultados podría ser que los enzimas recombinantes no estuvieran uniéndose a las integrinas ya sea porque el motivo RGD no estuviera lo suficientemente expuesto o que la secuencia de aminoácidos adyacente al motivo RGD no presentara la conformación que es necesaria para asegurar la especificidad y afinidad de unión de las integrinas a sus ligandos (Mason *et al.*, 1994; Rieder *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1996; Kunicki *et al.*, 1997). Para poder descartar esta posibilidad se realizaron ensayos de unión en fase sólida con las integrinas solubles tal como se había reportado previamente en ensayos con el virus intacto (Jackson *et al.*, 1996), y se pudo comprobar que la proteína recombinante se unía a las integrinas eficientemente (Apéndice A, figura 1). En el caso del ensayo con las células completas, ya se había demostrado en estudios anteriores la capacidad que tenían los enzimas recombinantes de unirse a varias líneas celulares de mamíferos entre ellas las BHK₂₁ (Villaverde *et al.*, 1996; Villaverde *et al.*, 1998). Por tanto descartamos la opción de que la falta de reactivación se debiera a un defecto en la unión del motivo RGD a las integrinas tanto en su forma soluble como en su contexto natural.

En estudios previos se había visto que proteínas recombinantes que llevaban insertado el péptido RGD del VFA promovían la unión a células con niveles comparables a la fibronectina y además esta unión era dependiente de la concentración de proteína (Villaverde *et al.*, 1996). Además se determinó que se producía una estimulación de la proliferación celular en placas cubiertas con estas proteínas recombinantes (Villaverde *et al.*, 1996) debida posiblemente al efecto que la unión del RGD a los receptores celulares ejerce sobre las señales de polaridad, posición, diferenciación y crecimiento celular (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). Con base en esta información quisimos incluir dentro de este estudio algunos ensayos para explorar en detalle el mecanismo de unión celular de este péptido recombinante e investigar el impacto que tenía la presentación de múltiples motivos RGD en la eficiencia de unión a las células. Se utilizó una proteína denominada HT7278CA (Cazorla *et al.*, 2001), que presentaba tres copias del péptido por monómero. Se detectó un estímulo de la unión celular en HT7278CA en comparación con mutantes que tenían una sola inserción (Artículo 1, figura 2A) y por otra parte una proliferación celular más rápida en placas cubiertas con esta proteína (Artículo 1, figura 3). Esta diferencia podría deberse a que la orientación espacial de los ligandos expuestos en esta proteína favorezcan de cierto modo la unión a las integrinas lo cual podría explicarse por un aumento de la estabilidad del complejo RGD-integrina que se ha probado que puede verse influenciada por la estructura de la molécula que contiene el RGD o la secuencia adyacente al motivo peptídico RGD (Orlando *et al.*, 1991).

En la proteína M278VP1 el péptido antigénico está insertado en la interfase de activación (Jacobson *et al.*, 1994), que está involucrada en la formación del sitio activo. De esta manera, el péptido puede causar impedimentos estéricos al acceso del sustrato que pueden reducirse mediante modificaciones conformacionales inducidas por la interacción entre antígeno y anticuerpo que se ven reflejadas en alteraciones de las constantes enzimáticas (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b; Ferrer-Miralles *et al.*, 2000). Por esta razón, la reactivación de esta proteína debe involucrar dichos cambios conformacionales en el sitio activo o cerca que permiten una mayor difusión del sustrato y por tanto una mejora de la unión e incluso una hidrólisis más rápida. Por otra parte, para la reactivación de esta proteína pueden ser necesarias las tensiones moleculares que se generan durante la unión bivalente del anticuerpo a los monómeros dentro del mismo tetrámero (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b) y que en el caso de las integrinas podría ser que no se produzcan debido a la naturaleza monovalente de la unión. A su vez, estas

diferencias en el comportamiento del enzima recombinante frente a los dos tipos de moléculas reforzaría la idea de que existe una diferencia entre los requerimientos estructurales de la unión a integrinas mediada por el motivo RGD y el reconocimiento por anticuerpos, siendo más restrictivos en este último caso.

Los datos obtenidos sugieren la existencia de una acomodación molecular de los residuos RGD recombinantes en las integrinas, de manera que si se genera algún cambio conformacional en el enzima, este cambio es funcionalmente indetectable. Esto se podría explicar por una alta flexibilidad molecular en el triplete RGD presentado en la superficie del enzima (Feliu *et al.*, 1998b) que le permite realizar una discriminación funcional entre la unión a integrinas y la unión a anticuerpos.

Como se había descrito anteriormente los anticuerpos han sido casi las únicas moléculas reconocidas como activadores de sensores enzimáticos (Brennan *et al.*, 1995; Benito *et al.*, 1996; Legendre *et al.*, 1999). Por otra parte se ha propuesto que la magnitud del cambio en la actividad enzimática puede estar condicionada por la afinidad de unión del complejo epitopo-anticuerpo y de la fracción del anticuerpo monoclonal que sea funcional (Brennan *et al.*, 1995), de manera que es posible que este tipo de interacción no se presente en el caso de las integrinas o si se presenta, la afinidad sea tan débil que la magnitud del cambio no se pueda determinar.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la interacción monovalente de un ligando diferente a un anticuerpo no es suficiente para producir una activación de los sensores enzimáticos y esto en cierto modo refuerza la hipótesis de que hace falta una unión de tipo bivalente involucrando más de un monómero para que se produzcan las modificaciones conformacionales que inducen una activación de los sensores basados en β -galactosidasa. Sin embargo, no se puede descartar que la naturaleza molecular de la unión de integrinas y anticuerpos al tripéptido RGD sea esencialmente distinta.

5.2 Obtención de un anticuerpo recombinante (scFv) dirigido contra el péptido RGD

Como se había descrito anteriormente, se ha propuesto que en la proteína M278VP1 la activación enzimática inducida por unión de anticuerpos depende de la unión bivalente en dos de las cuatro copias del péptido antigénico expuesto en la superficie del

enzima. Por otra parte, se ha determinado que el fragmento Fab de un anticuerpo altamente activador como el SD6 produce una señal mucho más débil a pesar de que se une al sensor M278VP1 (Ferrer-Miralles *et al.*, 2000). Por lo tanto, con los datos obtenidos hasta el momento parece razonable proponer que la unión bivalente del anticuerpo a diferentes monómeros de la β -galactosidasa estaría contribuyendo a la activación enzimática mediante una estabilización de todo el enzima, la inducción de cambios conformacionales locales del antígeno o una combinación de estos dos eventos. Para estudiar con más detalle esta posibilidad y en el contexto de lo dicho en el apartado anterior, se llevó a cabo el clonaje y producción en *Escherichia coli* del "single chain antibody fragment" (scFv) del anticuerpo monoclonal SD6 para analizar su potencial como posible activador de sensores enzimáticos.

En una primera parte del estudio llevamos a cabo el proceso de obtención del scFv y se generaron una serie de clones que producían proteínas cuya expresión podía ser detectada fácilmente ya que llevaban un "tag" peptídico denominado "E-tag". Algunos de estos clones reconocían específicamente el péptido GH23, pero había un pequeño grupo de las colonias recombinantes que a pesar de tener el "E-tag", no poseían la capacidad de reconocer el péptido. Se secuenció un clon de cada grupo y se pudieron predecir varias sustituciones de aminoácidos en las dos proteínas al comparar con la secuencia publicada para el SD6 (Verdaguer *et al.*, 1996). Además, ninguna de las mutaciones afectaba regiones de contacto con el epitopo.

El clon 73, productor de un scFv que no reconocía el péptido GH23, presentaba una sustitución Pro₄₇→Ser entre las CDR1 y CDR2 de la cadena liviana, y por otra parte una mutación Gly₉→Cys dentro del "linker". En el primer caso, se podría esperar que la sustitución tuviese un impacto directo en la conformación de la proteína. Además, la sustitución en el "linker", aunque no afectaba necesariamente la estructura secundaria predicha para esta región, que se ha demostrado es crítica para el reconocimiento del antígeno por parte de los scFv (Huston *et al.*, 1988, 1991), podría interferir en la correcta formación de los puentes disulfuro en el resto de la proteína. Por último, no podría descartarse que la sustitución Val₄₈→Ala muy cerca al CDR2 de la cadena pesada, pueda ser relevante también, ya que en algunos estudios se ha propuesto que aunque las interacciones de algunos residuos en las superficies de contacto son responsables de la afinidad por el antígeno es posible que estas interacciones puedan ser moduladas por

alteraciones de residuos fuera del sitio de unión (Hawkins *et al.*, 1993) (Artículo 2, figura 1). Aunque el origen de estas mutaciones puntuales no está claro, no es descartable que estuvieran originadas en la serie de PCRs que se llevaron a cabo durante el proceso de clonaje de los genes de las regiones variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo en el plásmido pCANTAB5E, a pesar de haber utilizado una DNA polimerasa "proof reading" (Perler *et al.*, 1996).

El clon 93 producía un anticuerpo recombinante que denominamos scFv93. Este presentaba una reactividad intensa frente al péptido GH23 en el ensayo de selección denominado "colony lift assay" mediante el cual se detectaban los fragmentos de anticuerpo que se unían directa y específicamente al antígeno, por lo que se eligió este clon para llevar a cabo los ensayos posteriores. Esta proteína se producía eficientemente a 1 µg/ml de cultivo, se secretaba como un polipéptido soluble y proteolíticamente estable. Por Western blot se descartó la presencia de dímeros. Los mismos constituyen uno de los principales problemas que se presentan en la producción de estos fragmentos de anticuerpos ya que la formación de agregados de scFv puede aumentar o reducir la señal obtenida en los ensayos. Por otra parte las partículas diméricas pueden tener una baja afinidad debido a efectos estéricos.

5.3 Inmunoreactividad del scFv93 y potencial para activar sensores enzimáticos

Se realizó una caracterización funcional del anticuerpo recombinante determinando su inmunoreactividad, y comprobamos que reconocía específicamente el péptido GH23 presentado en la superficie de la proteína M278VP1 (Artículo 2, figura 3). Las pequeñas diferencias que se observaron en el ELISA entre el scFv93 y el anticuerpo monoclonal parental SD6 podrían ser debidas a una afinidad diferente de los dos ligandos aunque también podría ser el efecto del uso de distintos anticuerpos secundarios para la detección. Una vez confirmada su capacidad de reconocimiento se probó si el scFv93 podía reactivar los enzimas recombinantes. Mediante estos ensayos se evidenció que esta molécula era incapaz de modificar la actividad específica de la β -galactosidasa (Artículo 2, figura 4). Sin embargo, el anticuerpo monoclonal SD6 activaba el enzima a pesar de que este anticuerpo exhibe una baja afinidad por péptidos GH23 recombinantes (Carbonell *et al.*, 1996; Carbonell *et al.*, 1998; Feliu *et al.*, 2000a). Por otra parte, se observó que el fragmento Fab también era capaz de promover la activación aunque en

menor magnitud que el monoclonal pero de una forma más eficiente que el Fab 3E5 (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b), que también reconoce el segmento GH23 (Carbonell *et al.*, 1998).

Estos resultados sugieren que la falta de activación mediada por el scFv93 en comparación con su equivalente Fab puede deberse a una presentación diferente de las regiones de unión al epítipo o que la activación enzimática involucre regiones del Fab que no están presentes en el scFv93. Por otra parte, indican que en términos generales, estas dos moléculas interactúan de una forma diferente con el péptido expuesto en la superficie del enzima, dando como resultado un patrón distinto de transducción de señal.

5.4 Sinergia en la activación de sensores basados en β -galactosidasa

La falta de reactivación por parte del scFv93 nos condujo a explorar si a pesar de este resultado, la especificidad de unión al epítipo permanecía intacta. Para esto utilizamos el scFv93 como competidor en un ensayo de activación de la β -galactosidasa mediada por el Fab SD6. Como control utilizamos también el Fab 4C4 que está dirigido contra un epítipo continuo de células B dentro del péptido GH23, pero diferente al reconocido por el anticuerpo SD6 (Verdaguer *et al.*, 1999), y que se ha probado que activa β -galactosidasas híbridas que contienen el péptido RGD (Cazorla *et al.*, 2002; Feliu *et al.*, 2002). A altas concentraciones molares de scFv93 se observó una inhibición de la activación mediada por el Fab SD6 pero no de aquella mediada por el fragmento 4C4 (Artículo 2, figura 5A y 5B). Esto nos confirmaba la alta especificidad del scFv93. Sin embargo, cuando utilizamos bajas concentraciones de scFv93 había un aumento en la activación enzimática inducida tanto por el Fab SD6 como por el Fab 4C4, revelando un efecto cooperativo entre los Fabs y el scFv.

Por otra parte este efecto cooperativo era mucho más evidente cuando se usaba la combinación scFv93-Fab 4C4 en comparación con el scFv93-Fab SD6. Esto podría deberse a la falta de efectos inhibitorios del scFv93 sobre la activación enzimática mediada por el Fab 4C4 a pesar de que ésta sea menos eficiente que en el caso del SD6. A su vez, esta ausencia de inhibición podría explicarse por la diferencia entre el epítipo reconocido por estos dos anticuerpos. En el caso del Fab SD6, la presencia del scFv93

puede generar efectos antagónicos cuyo equilibrio se desplaza de acuerdo a la proporción molar entre Fab y scFv presente en la mezcla de reacción.

Se evaluó la mecánica de la activación determinando las constantes enzimáticas para la mezcla del Fab 4C4 con el scFv93 en contacto con la proteína M278VP1. Como se había descrito anteriormente para esta misma proteína (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b), la modulación enzimática en estas condiciones se debía también a una reducción de K_m del enzima (Artículo 2, tabla 1), lo que indica que el mecanismo de activación enzimática tras la incubación con la mezcla molecular de anticuerpos monovalentes no es esencialmente diferente de aquella inducida por una única molécula de anticuerpo bivalente.

La mejora en la activación promovida por la mezcla de fragmentos hasta alcanzar los valores frecuentemente observados de respuesta enzimática (Ferrer-Miralles *et al.*, 2000) indica que se requieren contactos múltiples pero también heterogéneos para la activación enzimática que además puedan forzar modificaciones conformacionales específicas que tengan efectos a larga distancia. Esto concuerda con la alta sensibilidad que tiene la actividad de la β -galactosidasa de *E. coli* a los contactos moleculares. Se ha descrito que incluso enzimas no híbridos responden a anticuerpos anti- β -galactosidasa mediante modulación de su actividad (Celada y Strom, 1983), un hecho que solo puede explicarse por una combinación de un estado conformacional crítico del sitio activo y efectos conformacionales a larga distancia generados por la unión del anticuerpo (Celada y Strom, 1972; Verdaguer *et al.*, 1996). Por otra parte, el lazo activador del enzima, en el cual está insertado el péptido en la proteína M278VP1, participa no solo en la formación del sitio activo sino que además penetra en el monómero vecino a través de la interfase activadora (Jacobson *et al.*, 1994). Esta profunda conexión estructural entre los monómeros puede permitir la transmisión de efectos producidos por contacto y la transducción de señal en los sensores enzimáticos, afectando la conformación de las interfases activadoras.

Además, el tamaño relativo del enzima y de los ligandos de los anticuerpos comparado con la huella de unos 14 nm² que dejaría el anticuerpo en el enzima (Artículo 2, figura 6), permite suponer que en efecto es posible una unión múltiple tal como se deduce por la cooperatividad observada.

Queda aún sin aclarar cómo pueden ocurrir estos contactos heterogéneos con anticuerpos completos mientras que cuando se utilizan por separado moléculas de Fab o scFv se observa muy poca o ninguna respuesta del sensor. Independientemente de los mecanismos precisos involucrados en la sinergia molecular, la resolución de los cuales requerirá detallados estudios posteriores, los resultados obtenidos evidencian que la activación enzimática puede tener lugar a través de contactos moleculares monovalentes que ocurren simultáneamente en múltiples sitios de unión dentro del enzima.

5.5 Construcción y producción de proteínas de fusión scFv- β -galactosidasa

Los biosensores enzimáticos estudiados hasta el momento se caracterizaban por llevar la inserción de un péptido antigénico en diferentes sitios permisivos del enzima β -galactosidasa. Con estas proteínas híbridas se ha intentado determinar el tipo de interacciones moleculares necesarias para que se produzca la reactivación enzimática sin que se haya podido determinar aún con certeza el mecanismo exacto por medio del cual se lleva a cabo dicha reactivación. Como modelo alternativo a este tipo de biosensores, nos propusimos utilizar la ingeniería de anticuerpos para generar una serie de proteínas híbridas constituidas por un fragmento de anticuerpo scFv y la β -galactosidasa, y que mantuvieran tanto la actividad enzimática como las propiedades de unión al antígeno.

Para obtener esta nueva serie de proteínas, probamos tanto la inserción como la fusión de un fragmento de anticuerpo recombinante en varios sitios del enzima, que según se ha descrito previamente (Benito *et al.*, 1995; Feliu y Villaverde, 1998), son capaces de aceptar secuencias heterólogas. Exploramos los extremos amino y carboxi-terminal y un sitio permisivo interno, la posición 279-280 (artículo 3, figura 1). De los tres, tan solo el extremo amino-terminal toleró la fusión de la secuencia de 247 aminoácidos que reproducía el paratopo del anticuerpo monoclonal SD6. Esta proteína que denominamos PANlacZSD6 se degradaba parcialmente, produciéndose alrededor de un 30% en su forma intacta (artículo 3, figura 2). Además se producía como una proteína soluble y con un rendimiento de 1.1 μ g/ml de cultivo, y por otra parte retenía su actividad específica en comparación con la proteína LACZ parental. Estos resultados en su conjunto confirman observaciones anteriores que indicaban que proteínas con fusiones en el extremo amino-terminal eran mucho más estables que sus homólogas con fusiones en el extremo carboxi-terminal (Corchero y Villaverde, 1999), y a su vez conducen a descartar la

posición 279-280 (que es permisiva a inserciones de péptidos cortos), como candidata para la inserción de dominios proteicos largos.

5.6 Caracterización funcional de la proteína PANlacZSD6

Para evaluar la correcta exposición al solvente y la especificidad de unión de la proteína PANlacZSD6 se llevó a cabo un ELISA de captura. Mediante este ensayo se pudo determinar que dicha proteína era capaz de reconocer específicamente el antígeno contra el cual está dirigido el anticuerpo SD6 (Artículo 3, figura 3). Esto indica que el fragmento de anticuerpo fusionado era presentado correctamente, conservaba su funcionalidad y su especificidad de unión, lo cual concuerda con resultados de trabajos anteriores en los cuales los péptidos foráneos fusionados mantenían su capacidad antigénica y de interaccionar con receptores específicos (Carbonell *et al.*, 1998; Feliu *et al.*, 1998b).

Además, la proteína PANlacZSD6 mantenía su actividad enzimática aún estando unida al antígeno (Artículo 3, figura 4). Este es un resultado importante ya que la actividad de la β -galactosidasa puede verse afectada por la unión de anticuerpos dirigidos ya sea contra epítomos del enzima (Celada y Strom, 1972) o péptidos antigénicos insertados (Benito *et al.*, 1996; Ferrer-Miralles *et al.*, 2001). De modo que nos planteamos la idea de aprovechar esta característica para determinar si realizando un ensayo de modulación de actividad de la β -galactosidasa, en las mismas condiciones descritas para los biosensores tradicionales (Feliu *et al.*, 1998a; Feliu *et al.*, 2000b) pero en este caso utilizando el péptido GH23 como ligando, podíamos observar algún cambio en la actividad enzimática de estas proteínas híbridas que además fuera dependiente de la concentración de péptido añadido. Los resultados indicaron que al menos en las condiciones en las que normalmente había reactivación para los biosensores que llevaban insertado el sitio A no había reactivación de la proteína PANlacZSD6. Una posibilidad podría ser que en estas condiciones, donde todos los componentes se encuentran en solución, el péptido no se uniera a la proteína y por tanto el efecto de modulación de actividad no se produce. Otra alternativa podría ser que aunque el péptido se uniera, no ejerciera un efecto sobre el fragmento de anticuerpo que pudiera verse reflejado en modificaciones conformacionales del enzima que llevaran a su vez a un cambio en su actividad.

En términos de posibles aplicaciones prácticas, el hecho de que la proteína PANlacZSD6 presente una doble funcionalidad (unión al antígeno y propiedades catalíticas) hace que sea extremadamente útil en el contexto biomédico, concretamente para la detección de antígenos específicos. Un ejemplo inmediato es la aplicación de este principio a inmunoensayos de diagnóstico mediante el uso de anticuerpos recombinantes de tipo scFv acoplados a enzimas producidos en organismos recombinantes. Sin embargo, el espectro de posibilidades de una proteína de fusión enzima-anticuerpo de este tipo, podría abarcar también propósitos terapéuticos, como es el caso de algunos ejemplos ya descritos en los que se han obtenido moléculas quiméricas formadas por un scFv dirigido contra la fosfatasa alcalina de placenta humana y una RNAsa seminal bovina con capacidad antitumoral (Deonarain y Epenetos, 1994) que podrían ser utilizadas como inmunotoxinas, así como proteínas constituidas por un scFv que reconoce el antígeno carcinoembrionario y la carboxipeptidasa G2 (Bhatia *et al.*, 2000) o la fusión entre un scFv dirigido contra una molécula de adhesión celular y el enzima β -glucuronidasa (De Graaf *et al.*, 2002) que se utilizarían en un tipo de terapia que se denomina “antibody-directed enzyme prodrug therapy” (ADEPT).

En cuanto a aplicaciones de tipo diagnóstico, se han llevado a cabo fusiones entre la fosfatasa alcalina y fragmentos de anticuerpo para la detección de antígenos y para evitar el uso de un segundo anticuerpo conjugado en ELISA (Wels *et al.*, 1992; Griep *et al.*, 1999; Rau *et al.*, 2002). Sin embargo, la β -galactosidasa de *Escherichia coli* posee un espectro más amplio de sustratos entre los cuales está: el orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), rojo clorofenol galactopiranosido (CPRG), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal), Galacton®, di- β -D-galactopiranosido de fluoresceína (FDG), feniletil- β -D-tiogalactopiranosido (PETG) y β -metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MUG), que permiten la utilización de diferentes estrategias analíticas debido a que generan ya sea productos coloreados, fluorescentes o luminiscentes. Por otra parte, la facilidad con la que se puede purificar este enzima mediante cromatografía de afinidad (Ullman, 1984) y su tolerancia a múltiples inserciones peptídicas (Arís y Villaverde, 2000; Cazorla *et al.*, 2001) permitiría no solo una determinación enzimática rápida, sensible y adaptable en sistemas automatizados, sino también su posterior modificación para presentar diferentes dominios proteicos y obtener de esta manera una nueva combinación de funciones. Por tanto, se puede decir que la obtención de este nuevo tipo de β -

galactosidasas recombinantes confirma la flexibilidad que tiene este enzima para ser utilizada con diversos propósitos biotecnológicos.

5.7 Bibliografía

Argraves, W.S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K., Pierschbacher, M.D. y Ruoslahti, E. (1987). Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J. Cell. Biol.*, 105, 1183-1190.

Arís, A. y Villaverde, A. (2000). Molecular organization of protein-DNA complexes for cell-targeted DNA delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 278, 455-461.

Benito, A. y Villaverde, A. (1994). Insertion of a 27 amino acid viral peptide in different zones of *Escherichia coli* β -galactosidase: effects on the enzyme activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 123, 107-112.

Benito, A., Mateu, M.G. y Villaverde, A. (1995). Improved mimicry of a foot-and-mouth disease virus antigenic site by a viral peptide displayed on β -galactosidase surface. *Biotechnology*, 13, 801-804.

Benito, A., Feliu, J.X. y Villaverde, A. (1996). β -galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. *J. Biol. Chem.*, 271, 21251-21256.

Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P.W. y Baxt, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha_v\beta_3$) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.*, 69, 2664-2666.

Bhatia, J., Sharma, S.K., Chester, K.A., Pedley, R.B., Boden, R.W., Read, D.A., Boxer, G.M., Michael, N.P. y Begent, R.H. (2000). Catalytic activity of an *in vivo* tumor targeted anti-CEA

scFv::carboxypeptidase G2 fusion protein. *Int. J. Cancer*, 85, 571-577.

Brennan, C.A., Christianson, K., La Fleur, M.A. y Mandeck, W. (1995). A molecular sensor system based on genetically engineered alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5783-5787.

Carbonell, X., Benito, A. y Villaverde, A. (1996). Converging antigenic structure of a recombinant viral peptide displayed on different frameworks of carrier proteins. *FEBS Lett.*, 397, 169-172.

Carbonell, X., Feliu, J.X., Benito, A. y Villaverde, A. (1998). Display-induced antigenic variation in recombinant peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 773-777.

Cazorla, D., Feliu, J.X. y Villaverde, A. (2001). Variable specific activity of *Escherichia coli* β -galactosidase in bacterial cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 255-260.

Cazorla, D., Feliu, J.X., Ferrer-Miralles, N. y Antonio Villaverde. (2002). Tailoring molecular sensing for peptide displaying engineered enzymes. *Biotechnol. Lett.*, 24, 469-477.

Celada, F. y Strom, R. (1972). Antibody-induced conformational changes in proteins. *Q. Rev. Biophys.*, 5, 395-425.

Celada, F. y Strom, R. (1983). β -galactosidase: immune recognition of conformation and mechanism of

antibody-induced catalytic activation. *Biopolymers*, 22, 465-473.

Chambers, M.A., Dougan, G., Newman, J., Brown, F., Crowther, J., Mould, A.P., Humphries, M.J., Francis, M.J., Clarke, B., Brown, A.L. y Rowlands, D. (1996). Chimeric hepatitis B virus core particles as probes for studying peptide-integrin interactions. *J. Virol.*, 70, 4045-4052.

Corchero, J.L. y Villaverde, A. (1999). Tolerance of *Escherichia coli* β -galactosidase C-terminus to different-sized fusions. *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 644-649.

De Graaf, M., Boven, E., Oosterhoff, D., van der Meulen-Muileman, I.H., Huls, G.A., Gerritsen, W.R., Haisma, H.J. y Pinedo, H.M. (2002). A fully human anti-Ep-CAM scFv- β -glucuronidase fusion protein for selective chemotherapy with a glucuronide prodrug. *Br. J. Cancer*, 86, 811-818.

Deonarain, M.P. y Epenetos, A.A. (1994). Targeting phosphodiesterases as a strategy for killing tumor cells. *Cell Biophys.*, 25, 249-257.

Doi, N. y Yanagawa, H. (1999). Design of generic biosensors based on green fluorescent proteins with allosteric sites by directed evolution. *FEBS Lett.*, 453, 305-307.

Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A. y Hogg, N. (1992a). Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.*, 116, 219-226.

Dransfield, I., Cabanas, C., Barrett, J. y Hogg, N. (1992b). Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *J. Cell Biol.*, 116, 1527-1535.

Felding-Habermann, B. y Cheresch, D.A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 5, 864-868.

Feliu, J.X. y Villaverde, A. (1998). Engineering of solvent-exposed loops in *Escherichia coli* β -galactosidase. *FEBS Lett.*, 434, 23-27.

Feliu, J.X., Ramírez, E. y Villaverde, A. (1998a). Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in β -galactosidase molecular sensors. *FEBS Lett.*, 438, 267-271.

Feliu, J.X., Benito, A., Oliva, B., Avilés, F.X. y Villaverde, A. (1998b). Conformational flexibility in a highly mobile protein loop of foot-and-mouth disease virus: distinct structural requirements for integrin and antibody binding. *J. Mol. Biol.*, 283, 331-338.

Feliu, J.X., Carbonell, X. y Villaverde, A. (2000a). Successful mimicry of a complex viral antigen by multiple peptide insertions in a carrier protein. *FEBS Lett.*, 474, 87-92.

Feliu, J.X., Ramírez, E. y Villaverde, A. (2000b). Corrigendum to: Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in β -galactosidase molecular sensors. *FEBS Lett.*, 473, 123.

Feliu, J.X., Ferrer-Miralles, N., Blanco, E., Cazorla, D., Sobrino, F. y Villaverde, A. (2002). Enhanced response to antibody binding in engineered β -galactosidase enzymatic sensors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1596, 212-224.

Ferrer-Miralles, N., Feliu, J.X. y Villaverde, A. (2000). Molecular mechanisms for antibody-mediated modulation of peptide-displaying enzyme

sensors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275, 360-364.

Ferrer-Mirallas, N., Feliu, J.X., Vandevuer, S., Muller, A., Cabrera-Crespo, J., Ortmans, I., Hoffmann, F., Cazorla, D., Rinas, U., Prevost, M. y Villaverde, A. (2001). Engineering regulable *Escherichia coli* β -galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera. *J. Biol. Chem.*, 276, 40087-40095.

Griep, R.A., van Twisk, C., Kerschbaumer, R.J., Harper, K., Torrance, L., Himmler, G., van der Wolf, J.M. y Schots, A. (1999). pSKAP/S: An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins. *Protein Expr. Purif.*, 16, 63-69.

Hawkins, R.E., Russell, S.J., Baier, M. y Winter, G. (1993). The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. The interaction of mutant D1.3 antibodies with lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 234, 958-964.

Hellinga, H.W. y Marvin, J.S. (1998). Protein engineering and the development of generic biosensors. *Trends Biotechnol.*, 16, 183-189.

Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. y Oppermann H. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883.

Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E. y Oppermann, H. (1991). Protein engineering of single-chain Fv

analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol.*, 203, 46-88.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.

Jackson, T., Ellard, F.M., Ghazaleh, R.A., Brookes, S.M., Blakemore, W.E., Corteyn, A.H., Stuart, D.I., Newman, J.W. y King, A.M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.*, 70, 5282-5287.

Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R.A., Blakemore, W.E., Ellard, F.M., Simmons, D.L., Newman, J.W., Stuart, D.I. y King, A.M. (1997). Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin $\alpha_v\beta_3$ in vitro. *J. Virol.*, 71, 8357-8361.

Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F. y Matthews, B.W. (1994). Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature*, 369, 761-766.

Kunicki, T.J., Annis, D.S. y Felding-Habermann, B. (1997). Molecular determinants of Arg-Gly-Asp ligand specificity for β_3 integrins. *J. Biol. Chem.*, 272, 4103-4107.

Lee, J.O., Bankston, L.A., Arnaout, M.A. y Liddington, R.C. (1995). Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation?. *Structure*, 3, 1333-1340.

Legendre, D., Soumillon, P. y Fastrez, J. (1999). Engineering a regulatable enzyme for homogeneous immunoassays. *Nat. Biotechnol.*, 17, 67-72.

Li, R., Rieu, O., Griffith, D.L., Scott, D. y Arnaout, M.A. (1998). Two

functional states of the CD11b A-domain: correlations with key features of two Mn^{2+} -complexed crystal structures. *J. Cell Biol.*, 143, 1523-1534.

Mason, P.W., Rieder, E. y Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1932-1936.

Mateu, M.G., Valero, M.L., Andreu, D. y Domingo, E. (1996). Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J. Biol. Chem.*, 271, 12814-12819.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. y Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388, 882-887.

Mould, A.P., Akiyama, S.K. y Humphries, M.J. (1995). Regulation of integrin $\alpha_5\beta_1$ -fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.*, 270, 26270-26277.

Neff, S., Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P.W., Blystone, S.D., Brown, E.J. y Baxt, B. (1998). Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes de integrin $\alpha_v\beta_3$ as its receptor. *J. Virol.*, 72, 3587-3594.

Orlando, R.A. y Cheresh, D. (1991). Arginine-glycine-aspartic acid binding leading to molecular stabilization between integrin $\alpha_v\beta_3$ and its ligand. *J. Biol. Chem.*, 266, 19543-19550.

Perler, F.B., Kumar, S. y Kong, H. (1996). Thermostable DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.*, 48, 377-435.

Pytela, R., Pierschbacher, M.D. y Ruoslahti, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell*, 40, 191-198.

Rau, D., Kramer, K. y Hock, B. (2002). Single-chain Fv antibody-alkaline phosphatase fusion proteins produced by one-step cloning as rapid detection tools for ELISA. *J. Immunoassay Immunochem.*, 23, 129-143.

Rieder, E., Baxt, B. y Mason, P.W. (1994). Animal-derived antigenic variants of foot-and-mouth disease virus type A12 have low affinity for cells in culture. *J. Virol.*, 68, 5296-5299.

Ruoslahti, E. y Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238, 491-497.

Smith, J.W., Piotrowicz, R.S. y Mathis, D. (1994). A mechanism for divalent cation regulation of β_3 -integrins. *J. Biol. Chem.*, 269, 960-967.

Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F. y Hynes, R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell*, 46, 271-282.

Ullmann, A. (1984). One-step purification of hybrid proteins which have β -galactosidase activity. *Gene*, 29, 27-31.

Verdaguer, N., Mateu, M.G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E. y Fita, I. (1995). Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp

motif in the interaction. *EMBO J.*, 14, 1690-1696.

Verdaguer, N., Mateu, M.G., Bravo, J., Domingo, E. y Fita, I. (1996). Induced pocket to accommodate the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in a neutralizing antibody against foot-and-mouth-disease virus. *J. Mol. Biol.*, 256, 364-376.

Verdaguer, N., Sevilla, N., Valero, M.L., Stuart, D., Brocchi, E., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., Mateu, M.G. y Fita, I. (1998). A similar pattern of interaction for different antibodies with a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus: implications for intratypic antigenic variation. *J. Virol.*, 72, 739-748.

Verdaguer, N., Schoehn, G., Ochoa, W.F., Fita, I., Brookes, S., King, A., Domingo, E., Mateu, M.G., Stuart, D. y Hewat, E.A. (1999). Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. *Virology*, 255, 260-268.

Villaverde, A., Feliu, J.X., Harbottle, R.P., Benito, A. y Coutelle, C. (1996). A recombinant, arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif from foot-and-mouth disease virus binds mammalian cells through vitronectin and, to a lower extent, fibronectin receptors. *Gene*, 180, 101-106.

Villaverde, A., Feliu, J.X., Aris, A., Harbottle, R.P., Benito, A. y Coutelle, C. (1998). A cell adhesion peptide from foot-and-mouth disease virus can direct cell targeted delivery of a functional enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, 59, 294-301.

Wels, W., Harwerth, I.M., Zwickl, M., Hardman, N., Groner, B. y Hynes, N.E. (1992). Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to

the human erbB-2 receptor. *Biotechnology*, 10, 1128-1132.

Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A. y Nemerow, G.R. (1993). Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73, 309-319.

6. APÉNDICE A

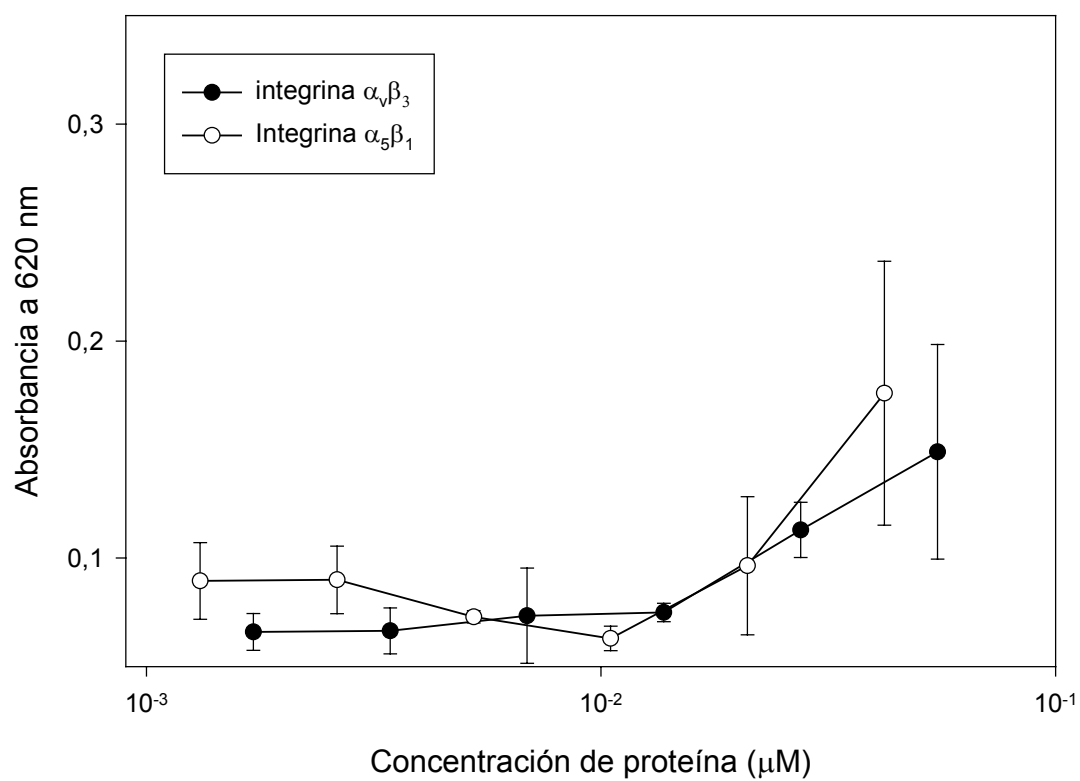


Figura 1. Ensayo de unión en fase sólida de la proteína M278VP1 a las integrinas solubles en presencia de $MnCl_2$.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La actividad enzimática de la proteína M278VP1, que es modulada por anticuerpos anti-RGD, no se ve modificada por su interacción con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ solubles y asociadas a la membrana celular. Esto sugiere que los residuos RGD recombinantes se acomodan molecularmente a las integrinas de forma que si se produce algún cambio conformacional en el enzima, éste es funcionalmente indetectable.
2. Se realizó el clonaje y producción en *Escherichia coli* de un fragmento de anticuerpo recombinante scFv del anticuerpo monoclonal SD6, que se denominó scFv93. Esta proteína, que presenta una intensa reactividad con el péptido antigénico GH23, se produce eficientemente en *Escherichia coli* a 1 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo, secretándose como un polipéptido soluble y proteolíticamente estable sin mostrar síntomas de toxicidad.
3. Las secuencias de los clones scFv93 y scFv73 mostraron varias sustituciones de aminoácidos, sin que ninguna afectara regiones de contacto con el epitopo. Las mutaciones en la cadena pesada en una región cercana al linker, así como aquellas ubicadas al inicio y al final de la cadena liviana del scFv93 no tuvieron ningún efecto sobre la eficiencia de reconocimiento de este anticuerpo.
4. El clon productor del anticuerpo scFv73, que no mostraba reactividad con el péptido GH23, presentaba una sustitución Pro₄₇→Ser cerca al CDR2 de la cadena liviana, una mutación Gly₉→Cys en la región del "linker" y una sustitución Val₄₈→Ala cerca al CDR2 de la cadena pesada. Por tanto, alguna de estas mutaciones o la combinación de todas ellas podría ser responsable de la falta de reconocimiento del epitopo por parte del scFv73.
5. La falta de activación de M278VP1 mediada por el scFv93, comparada con su Fab equivalente, sugiere una presentación diferente de las regiones de unión al epitopo o una participación en la activación enzimática de las regiones del Fab que no están presentes en el scFv93. Esto indica también que estas dos moléculas interactúan de forma diferente con el péptido GH23 expuesto en la superficie de la proteína M278VP1, dando como resultado un patrón de transducción de señal diferente que en

- el caso del scFv93 puede ser negativo ya que no genera un cambio detectable en la actividad enzimática.
6. Concentraciones molares del scFv93 alrededor de $4 \times 10^{-7} \text{M}$ inhiben la activación mediada por el fragmento Fab del SD6 pero no aquella en la que participa el Fab 4C4. Esto indica que el scFv93 reconoce específicamente el epitopo hacia el cual está dirigido el anticuerpo monoclonal SD6.
 7. Concentraciones molares del anticuerpo recombinante en un rango de $2 \times 10^{-7} \text{M}$ a $4 \times 10^{-8} \text{M}$ aumentan el grado de activación enzimática provocada por los fragmentos de anticuerpo SD6 y 4C4. Esta cooperación es mucho más evidente al combinar los fragmentos de pares no homólogos que al mezclar el scFv y el Fab del mismo anticuerpo.
 8. El efecto cooperativo entre el scFv93 y el Fab 4C4 por medio del cual se produce la modulación enzimática se debe a una reducción de un 90% en la K_m del enzima. Por tanto, la mecánica de activación que se presenta en este caso es esencialmente la misma que aquella provocada por moléculas individuales de anticuerpo bivalente.
 9. La modulación enzimática de M278VP1 puede ocurrir a través de contactos moleculares monovalentes que tienen lugar simultáneamente en múltiples sitios de unión del enzima y que pueden forzar modificaciones conformacionales específicas con efectos a larga distancia. Además, dichas interacciones pueden ser llevadas a cabo por ligandos heterogéneos e independientes.
 10. Se fusionó el anticuerpo recombinante scFv93 en tres sitios permisivos del enzima β -galactosidasa, concretamente en los extremos carboxi y amino-terminal y la posición 279-280, generándose de este modo las proteínas PAlacZCSD6, PANlacZSD6 y PA278SD6 respectivamente. En ningún caso la producción de la proteína recombinante ejerció efectos tóxicos en las células de *Escherichia coli*.
 11. Los cultivos productores de la proteína recombinante PAlacZCSD6 presentaron la mayor actividad enzimática ($9.477,1 \text{ U/ml} \pm 813,7$) que era debida esencialmente a fragmentos de degradación. La actividad enzimática de los cultivos productores de la

proteína PANlacZSD6 fue de 5.439,6 U/ml \pm 124.8 y en el caso de la proteína PA278SD6 fue indetectable.

12. Los análisis por Western blot confirmaron una proteólisis diferencial de las fusiones, de modo que tan solo la proteína PANlacZSD6 pudo observarse en su forma intacta. Esta forma representaba entre un 25 a 30% de la proteína inmunoreactiva mientras que el 70% restante estaba constituido principalmente por el fragmento de degradación de 90 kDa y algunas trazas del fragmento de la β -galactosidasa nativa.
13. La proteína PANlacZSD6 se produce de forma soluble hasta en un 90%, su actividad específica (2.223,48 \pm 92,76 U/ μ g) es similar a la de la proteína LACZ (2.765 \pm 347 U/ μ g) y su rendimiento en matraces de cultivo tras dos horas de inducción es de 1.1 μ g/ml de cultivo.
14. La proteína PANlacZSD6 presenta correctamente el anticuerpo recombinante scFv93 y se une específicamente al péptido A21 en ELISA a través del dominio scFv ubicado en el extremo amino-terminal.
15. La proteína de fusión PANlacZSD6 es enzimáticamente activa incluso cuando interacciona con el antígeno.
16. El péptido antigénico GH23 no tiene la capacidad de modular la actividad enzimática de la β -galactosidasa al menos en las condiciones en las que se produce la reactivación de sensores del tipo M278VP1.
17. El modelo scFv- β -galactosidasa representado por la proteína PANlacZSD6 puede ser una alternativa a otros modelos scFv-enzima para ser aplicado biotecnológicamente con fines diagnósticos que involucren la detección de antígenos.

8. AGRADECIMIENTOS

8. AGRADECIMIENTOS

Es muy difícil expresar en unas pocas líneas todo lo que se puede agradecer a tantas personas que de una u otra forma han hecho que este trabajo se haya podido realizar y muchas de las cuales no sólo han compartido el trabajo sino algo casi tan importante como es la convivencia diaria durante casi cinco años.

En primer lugar a mis padres y mi hermano, que siempre me han apoyado en todos los sentidos, me han animado en cada momento no solo con sus consejos sino también con su ejemplo de trabajo y perseverancia. Que me impulsaron a cumplir una meta más en mi vida profesional y que han sido capaces de soportar tantos años de separación con la ilusión de ver cumplidos mis sueños.

A Toni Villaverde, por ser ante todo un excelente educador, en muchos sentidos. Por aceptarme en su grupo y darme la oportunidad de aprender, por darme ánimos siempre que tendía a la angustia y la desesperación cuando algo no salía como yo esperaba. Pero sobretodo por las grandes dosis de paciencia porque sé que no ha sido nada fácil este proceso para ninguno de los dos.

Al Dr. Avilés, por aceptar ser mi tutor y por tener confianza en mi trabajo, además de tratarme siempre con la amabilidad con la que se trata a un invitado.

Obviamente agradecimientos muy especiales a mis compañeros del laboratorio de Micro Aplicada. A los que ya no están: Pepe, Esther, Jordi, Dani, Manel, gracias por todo lo que me enseñaron cada uno de ustedes. A Neus, mi codirectora, fue un verdadero placer trabajar contigo, gracias por compartir todos tus conocimientos conmigo de una manera tan desinteresada y generosa. A Xavicín, por ser como eres, por tener la paciencia de un santo a la hora de resolver mis múltiples dudas y por ser un compañero excepcional. A mis compañeras y amigas: Anita, si se pudiera definir lo más cercano a la calidez humana en su forma más perfecta yo diría que eres tú, una excelente trabajadora, colega, amiga, persona, tengo tantas cosas que agradecerle que unas simples palabras no lo pueden expresar, pero ante todo y resumiendo, gracias por hacer que mis días aquí estuvieran llenos de optimismo y alegría, incluso en los momentos más duros y difíciles, que últimamente fueron demasiados. Y a Mar, compañera de veranos de trabajo, de

congresos y como no...de fiestas también, gracias por todo lo que me has enseñado, por darle siempre una solución y una visión alternativa a los problemas y por hacerme ver las cosas de una forma más racional y calmada. A los nuevos integrantes del grupo, Unai, Núria, Andrea, y a Vero, gracias por soportar mis estados de ansiedad “pre-tesis” y comprender que no pudiera dedicarles el tiempo que se merecían.

A los vecinos de inmunología por su colaboración con algunas dudas metodológicas y por dejarnos uno que otro reactivo indispensable. A la gente de inmuno celular, Aura, Manu, Mercé, Iñaki, Bea, Raúl, David, Laia, Edgardo, lo mismo que a Ferrán y a Sergi, a todos ellos gracias por compartir muchas comidas y muchas conversaciones, así como también cumpleaños y una que otra fiestecita.

A Juan Checa y a Vicenç, por procurar que todo siempre estuviera a punto y funcionando, lo que hace que nuestro trabajo sea siempre más eficiente. A Paqui por su ayuda con los cultivos celulares.

A Almudena, porque gracias a su eficacia, a su buena disposición y a su organización, nuestras horas de trabajo se hicieron mucho más cómodas y provechosas. Pero también y muy especialmente, en los últimos meses, por tu compañía en nuestras horas de “relax”, por darme el soporte necesario para cumplir con nuestra cita semanal con la piscina.

A Tânia, gracias por tu sonrisa y por escucharme todas mis historias con paciencia. Por confiar en mis conocimientos y pedirme ayuda, porque eso también es importante.

A Nati, Amelia, Eva, Elena, y a Teresa aunque ya no esté aquí, porque sin su trabajo y su colaboración habría sido muy difícil por no decir imposible, llegar hasta este punto.

En general a toda la gente del IBB, es muy difícil dar las gracias a todos pero al menos lo intentaré por grupos, a las personas de Genética Molecular Bacteriana: Raquel, Irma, Núria, Ignasi, porque al tener tantas relaciones en común compartimos muchas cosas de grupo, a la gente de Biología Molecular los que están ahora y los que se han ido

como Xavi Serra y Andreu, a los de Enzimología, Citogenética, Neuroquímica, porque después de tantos años compartidos nos volvemos casi como una familia. Un agradecimiento especial a Oscar Conchillo, por ayudarme a solucionar uno que otro problemilla informático super urgente.

Y ahora saliendo un poco del IBB, gracias a la gente del grupo de Marina Luquín, a Esther Julián por estar siempre dispuesta a colaborar y por recibir muchas de mis llamadas siempre con amabilidad, y a Mercé, Pep, Manolo y Lidia porque cada vez que pasaba por allí me recibieron como una más del grupo.

A toda la gente que más que compañeros de trabajo fueron amigos, muchos de los cuales ya no están aquí y que hicieron que estos años no fueran sólo un “paréntesis” en mi vida, a Mónica porque su amistad en mis primeros años aquí fue de las cosas más positivas que pudieron sucederme, a Edna, Julieta, Maritza, Rocío por compartir el sentimiento de estar lejos de nuestros hogares.

A mis amigos de siempre, Carlos, por estar siempre allí, por ayudarme y aconsejarme científica y personalmente, tu apoyo tiene un gran valor para mi. Y a Diana, por ser mi primera maestra y por estar siempre a mi lado, así sea en la distancia, porque cuando se está lejos de casa el mail más que un lujo es una necesidad.

A mis amigos fuera del ambiente estrictamente laboral, Gisele, Esther Carreras, Jose Antonio y Eusebi, por darle “vida” a mi estancia aquí. Así como a mis últimos amigos, de fiestas, tertulias y paseos, en especial a Zeca, por ser la persona que es, por tratarme con tanto cariño y estar siempre dispuesto a colaborar, incluso por encima de sus propios intereses.

Y en general a todas las personas que pasaron por mi vida durante este tiempo en Barcelona, porque con seguridad cada una dejó una huella importante que nunca olvidaré.

