



Universitat Autònoma de Barcelona

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Y DE BIOMEDICINA
“VICENT VILLAR I PALASÍ”
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y DE MICROBIOLOGÍA

**INGENIERIA DE ANTICUERPOS APLICADA AL
DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE
BIOSENSORES ENZIMÁTICOS**

Pilar Lucía Alcalá Morales

2002

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

INGENIERIA DE ANTICUERPOS APLICADA AL DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE BIONSENSORES ENZIMÁTICOS

Memoria presentada por Pilar Lucía Alcalá Morales, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Visto bueno del director y del tutor de la Tesis,

Dr. Antonio Villaverde Corrales
Director

Dr. Francesc Xavier Avilés
Tutor

Bellaterra, diciembre de 2002

**A mi familia, ejemplo de
trabajo, dedicación, unidad
y apoyo mutuo**

“No basta adquirir sabiduría, es
preciso además saber usarla”.

Cicerón

1. INDICE Y ABREVIATURAS

INDICE

1. Abreviaturas	13
2. Introducción	15
2.1 Ingeniería de proteínas	17
2.1.1 Ingeniería de anticuerpos	18
2.1.2 “Phage display”	20
2.2 Biosensores	22
2.2.1 Biosensores moleculares	23
2.2.2 β -Galactosidasa como elemento transductor	24
2.2.3 El sitio antigénico A del virus de la fiebre aftosa (VFA) como péptido funcional	28
2.2.4 Las proteínas M278VP1 y JX795A como biosensores	34
2.2.5 Modelos sobre mecanismos de reactivación enzimática	38
2.3 Bibliografía	44
3. Objetivos	57
4. Artículos	61
4.1 Artículo I	
Efficient accommodation of recombinant, foot-and-mouth disease virus RGD peptides to cell-surface integrins	65
4.2 Artículo II	
Co-activation of antibody-responsive, enzymatic sensors by a recombinant scFv antibody fragment produced in <i>E. coli</i>	75
4.3 Artículo III	
Enginnering of <i>Escherichia coli</i> β -galactosidase for solvent-display of a functional scFv antibody fragment	88
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	
5.2 Obtención de un anticuerpo recombinante (scFv) dirigido contra el péptido RGD	

- 5.3 Inmunoreactividad del scFv93 y potencial para activar sensores enzimáticos
- 5.4 Sinergia en la activación de sensores basados en β -galactosidasa
- 5.5 Construcción y producción de proteínas de fusión scFv- β -galactosidasa
- 5.6 Caracterización funcional de la proteína PANlacZSD6
- 5.7 Bibliografía
- 6. Apéndice A
- 7. Conclusiones
- 8. Agradecimientos

1. ABREVIATURAS

ADE:	del inglés <i>antibody-dependent enhancement</i> , vía alternativa de infección de la célula por el VFA
ADEPT:	del inglés <i>Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
AMEF:	del inglés <i>Antibody mediated enzyme formation</i>
βgal:	Beta-galactosidasa
BHK:	del inglés <i>baby hamster kidney</i> , línea celular de riñón de hamster
CDRs:	del inglés <i>complementarity determining regions</i> . Regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo, existen tres en cada dominio variable
C_H1, C_H2, C_H3, C_H4:	Dominios constantes de la cadena pesada
C_L:	Dominio constante de la cadena liviana
COO⁻:	Carboxi
CPRG:	Rojo clorofenol galactopiranosido
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés <i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
Fab:	Fragmento de un anticuerpo, de unos 50 kDa, que lleva el sitio de unión al antígeno (<i>Fragment having the antigen binding site</i>). Este fragmento contiene los dominios V _L -C _L de la cadena liviana y C _V -C _H 1 de la cadena pesada unidas por un puente disulfuro
F(ab')₂:	Fragmento de un anticuerpo generado por la proteólisis con pepsina. Presenta unión divalente con el antígeno
Fc:	Fragmento cristizable de un anticuerpo. Contiene los dominios C _H 2-C _H 3 en el caso de la IgG
FcR:	Receptor que reconoce y une la fracción Fc de un anticuerpo
FDG:	di-β-D-galactopiranosido de fluoresceína
Fv:	Fragmento variable del anticuerpo. Corresponde a los dominios variables (V _L y V _H) de las cadenas liviana y pesada, respectivamente
FW:	del inglés <i>framework</i> . Regiones de estructura alterna del anticuerpo
GFP:	del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>
H:	Cadena pesada de un anticuerpo
HIV-1:	del inglés <i>human immunodeficiency virus</i> tipo 1
IgG, IgA, IgM, IgE, IgD:	Isotipos de las cadenas pesadas. Inmunoglobulinas G, A, M, E, D

IRES:	del inglés <i>internal ribosome entry site</i> . Secuencia interna de entrada de ribosomas
k_{cat}:	Constante catalítica
k_{cat}/K_m:	Eficiencia catalítica
K_m:	Constante de Michaelis-Menten
L:	Cadena liviana de un anticuerpo
λ_{max}:	Longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia
mAb:	Anticuerpo monoclonal
MUG:	β -metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido
NH_2^+:	Amino
ONPG:	Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
PETG:	Feniletíl- β -D-tiogalactopiranosido
PCRs:	del inglés <i>polimerase chain reactions</i> . Reacciones en cadena de la polimerasa
RNA:	del inglés <i>ribonucleic acid</i> . Acido ribonucleico
scFv:	del inglés <i>single-chain Fv</i> , Fv producido como cadena polipeptídica única a partir de una fusión de los genes de las cadenas pesada (V_H) y liviana (V_L) de un anticuerpo, separadas por un fragmento oligopeptídico espaciador. El péptido espaciador más utilizado suele ser de 15 residuos: $(Gly_4Ser)_3$
TSP:	del inglés <i>Tailspike protein</i> , proteína de la cola del bacteriófago P22 de <i>Salmonella typhimurium</i> , codificada en el gen 9 de dicho bacteriófago
VFA:	Virus de la fiebre aftosa
V_H:	Dominio variable de la cadena pesada
VIA:	del inglés <i>virus-infection associated antigen</i> . Antígeno asociado a la infección viral
V_L:	Dominio variable de la cadena liviana
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Ingeniería de proteínas

La ingeniería de proteínas puede definirse como la disciplina científica que busca personalizar la función de las proteínas mutando sus genes (Winter *et al.*, 1982; Wilkinson *et al.*, 1984). Generada hace unos 20 años por la combinación de avances poderosos en la biología estructural y la ingeniería genética, la ingeniería de proteínas ha progresado rápidamente, dando resultados importantes para entender cómo trabajan las proteínas, y para aplicaciones prácticas en el laboratorio, en la medicina y en la industria. Aunque el término "ingeniería de proteínas" puede aplicarse a diversos tipos de metodologías y metas definidas, quizás el área hacia donde la mayoría del trabajo se ha enfocado es la cuestión sobre cómo la estructura determina la función (Kossiakoff y Smith, 1993). El entendimiento de los principios estructurales que definen la función proteica se refiere a todos los niveles de información, desde el primario al cuaternario. Obviamente, la ingeniería de proteínas es más poderosa cuando se conoce la estructura tridimensional de la proteína y cuando ésta se puede usar para definir experimentos, así como para interpretar los resultados (Erickson y Abdel-Meguid, 1994).

Los primeros trabajos de diseño y construcción de nuevas proteínas utilizaban técnicas basadas en mutagénesis dirigida, por medio de la cual pueden introducirse una o más mutaciones puntuales dentro de una proteína con base en un análisis tridimensional de la estructura proteica, y una mutagénesis a gran escala por adición, sustitución o delección de fragmentos polipeptídicos. Por medio de la ingeniería de proteínas se han podido producir de forma recombinante anticuerpos, hemoglobina e insulina para ser usados como agentes terapéuticos y toxinas para su uso como vacunas entre otras aplicaciones. También se han podido analizar las propiedades de las proteínas a través de ensayos con mutantes obtenidos en el laboratorio. Por ejemplo, determinando los sitios activos y las propiedades alostéricas de enzimas y por tanto, evaluando el papel de las interacciones no-covalentes en la catálisis y la función de residuos catalíticamente importantes, ubicando los sitios de unión para determinar la energía del reconocimiento molecular, y trazando la vía y energía del plegamiento y estabilidad proteicos (Fersht y Winter, 1992).

Existen varios motivos por los cuales la unión y la catálisis son dos de las funciones proteicas más importantes que se pueden modificar. En primer lugar, porque la capacidad para controlar y manipular los determinantes del reconocimiento biomolecular y la catálisis pueden mejorar la comprensión de los procesos biológicos fundamentales. En segundo lugar, porque las tecnologías que permiten la determinación rápida de la especificidad de unión de prácticamente cualquier molécula blanco pueden proporcionar reactivos de afinidad para el análisis bioquímico, bioseparaciones, aplicaciones diagnósticas y terapia. Y en tercer lugar, porque la capacidad de alterar la especificidad de sustrato y el funcionamiento de los enzimas puede facilitar la síntesis de productos químicos finos (por ejemplo, glicosil transferasas) y permitir la modificación de moléculas biológicas *in vitro* y posiblemente *in vivo* (por ejemplo, nuevas endopeptidasas).

2.1.1 Ingeniería de anticuerpos

Los anticuerpos poseen una serie de propiedades que los convierten en moléculas de gran interés para propósitos de ingeniería. Su estructura consiste en cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas livianas (L) (24 kDa / 220 aminoácidos cada una) y dos cadenas pesadas (H) (55-70 kDa / 440 aminoácidos cada una) que están unidas entre sí por puentes disulfuro y otras uniones no covalentes (Harlow y Lane, 1988; Roitt, 1991) (Figura 1). Tanto la cadena pesada como la liviana contienen varias secciones homólogas formadas por secuencias de aminoácidos que son similares mas no idénticas. Estas unidades homólogas están formadas por 110 aminoácidos aproximadamente y se llaman dominios de inmunoglobulinas. Cada cadena liviana está conformada por un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L). Existen dos tipos de cadena liviana, lambda (λ) y kappa (κ). La cadena pesada contiene un dominio variable (V_H) y 3 ó 4 dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} , dependiendo de la clase de anticuerpo o del isotipo). Existen 5 tipos diferentes de cadenas pesadas (isotipos): IgG, IgA, IgM, IgE e IgD (γ , α , μ , ϵ y δ). La región ubicada entre los dominios C_{H1} y C_{H2} se denomina región bisagra ya que proporciona flexibilidad a los dos brazos Fab de la molécula de anticuerpo, permitiendo que se abran y cierren para acomodar la unión de dos determinantes antigénicos separados por una distancia fija.

Los estudios de estructura/función llevados a cabo para la inmunoglobulina G (IgG) han ayudado a descubrir que enzimas proteolíticas como la papaína pueden separar

la molécula en fragmentos que poseen propiedades biológicas específicas. La papaína rompe la molécula de IgG en la región de bisagra para producir dos fragmentos idénticos de unión al antígeno (Fab), que retienen su capacidad de unión, y una región del fragmento que no se une al antígeno denominada región del fragmento cristizable (Fc) (Figura 1). El dominio Fc está glicosilado y posee muchas funciones efectoras (unión al complemento, unión a receptores celulares en macrófagos y monocitos, entre otras). Estos dominios no sólo se pueden obtener por digestión proteolítica. El fragmento Fab por ejemplo, puede producirse separado del resto del anticuerpo utilizando técnicas de biología molecular, e incluso se pueden crear anticuerpos biespecíficos en los cuales dos fragmentos Fab se unen covalentemente y cada uno de ellos conserva una única especificidad de antígeno (Fanger *et al.*, 1991).

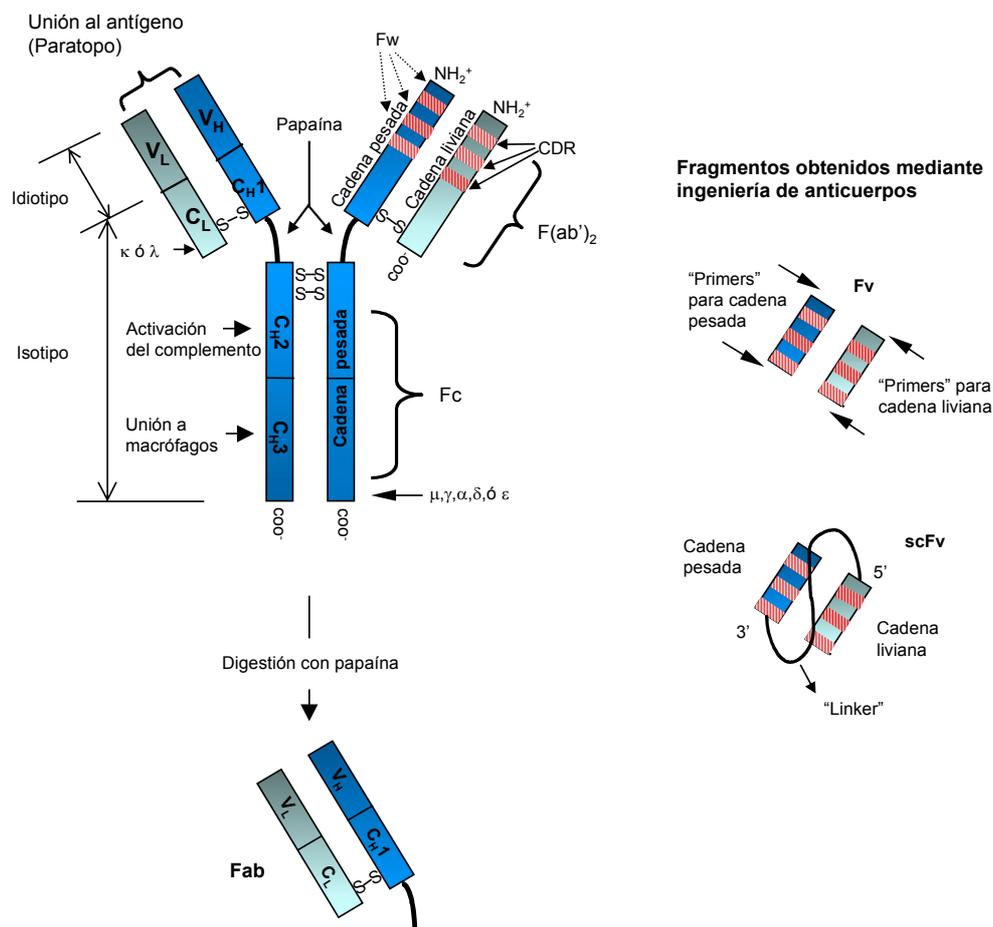


Figura 1. Representación esquemática de una molécula de anticuerpo IgG. Se muestran la composición en subunidades y la distribución de dominios dentro de las cadenas polipeptídicas. En la parte izquierda abajo se muestra el fragmento Fab generado por digestión proteolítica y en la derecha los fragmentos obtenidos por tecnología recombinante. Modificada a partir de la imagen hecha por Molecular Probes, Inc.

La mayor parte de la investigación en ingeniería de anticuerpos se ha enfocado hacia los dominios de unión al antígeno. La gran diversidad en el repertorio de anticuerpos permite seleccionar y generar moléculas con una determinada especificidad de antígeno, que pueden ser utilizadas para aplicaciones en medicina, terapia, diagnóstico o el desarrollo de catalizadores basados en anticuerpos. Esta inmensa diversidad está contenida en tan sólo seis lazos adyacentes denominados regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDRs), tres en cada dominio variable, las cuales unen el antígeno. Las CDRs pueden variar en secuencia, tamaño y conformación, y se encuentran entre regiones "framework" (FW) que son relativamente constantes (Roitt, 1991) (Figura 1).

En 1988, los grupos de Skerra y Better dieron un gran impulso a las técnicas de ingeniería de anticuerpos demostrando que en *Escherichia coli* se podían producir fragmentos de anticuerpo. El más pequeño de tales fragmentos es el Fv ("fragment variable"), que se obtiene por asociación de los dominios variables de la cadena pesada (V_H) y la cadena liviana (V_L) del anticuerpo (Better *et al.*, 1988; Skerra y Plückthun, 1988). Sin embargo, las interacciones hidrofóbicas entre estos dos dominios no son muy fuertes y por tanto se necesitaba crear un enlace covalente entre las cadenas V_H y V_L para obtener una molécula estable y minimizar los problemas de plegamiento que se presentaban cuando las dos cadenas se producían individualmente. La aproximación más común es usar un "linker" peptídico flexible de 15-20 residuos para unir los dos dominios. La secuencia más utilizada es $(Gly_4Ser)_3$, que está diseñada para que sirva de puente en el espacio de 3.5 nm que hay entre el extremo carboxi-terminal de la cadena V_H y el extremo amino-terminal de la cadena V_L . El fragmento resultante se denomina "single-chain Fv fragment" o scFv (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988) (Figura 1) y se ha mostrado que su afinidad y estabilidad son, generalmente, comparables con las del anticuerpo nativo (Huston *et al.*, 1988; Takkinen *et al.*, 1991). Otra aproximación es crear un puente disulfuro en la interfase entre la V_H y la V_L (Reiter *et al.*, 1994), siendo generalmente más estable que el scFv a la desnaturalización térmica en suero.

2.1.2 "Phage display"

Una de las estrategias que tiene una gran aplicabilidad en la ingeniería de proteínas es la metodología de "phage display". La exposición de proteínas sobre la

superficie de bacteriófagos mediante fusión a una proteína menor pIII de la cubierta del fago (Smith, 1985), junto con la generación de amplios repertorios macromoleculares y el uso de poderosos esquemas de selección-amplificación, ha llevado al aislamiento de varios tipos de proteínas útiles en el estudio de las propiedades de unión a ligandos así como del plegamiento y catálisis (Roberts *et al.*, 1992; Lowman y Wells, 1993; Winter *et al.*, 1994; Greisman y Pabo, 1997). En particular, ahora es posible aislar anticuerpos dirigidos contra virtualmente cualquier antígeno de interés a partir de librerías de anticuerpos en fagos (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1994; Nissim *et al.*, 1994; Vaughan *et al.*, 1996; Pini *et al.*, 1998). Incluso, se han hecho intentos de utilizar la tecnología de "phage display" para la selección de nuevas actividades enzimáticas a partir de colecciones grandes de librerías de enzimas expuestas en fagos (Widersten y Mannervik, 1995; Pedersen *et al.*, 1998; Demartis *et al.*, 1999; Jestin *et al.*, 1999).

Actualmente, el aislamiento de anticuerpos dirigidos contra proteínas purificadas (utilizando la tecnología de hibridoma o librerías de "phage display"), es en cierto modo un procedimiento estándar. Mientras que para muchas aplicaciones los anticuerpos pueden ser caracterizados convenientemente utilizando métodos convencionales (ELISA, inmunoblots, inmunoquímica, inmunofluorescencia), existen otras aplicaciones límite de la ingeniería de anticuerpos que requieren un análisis más detallado del proceso de unión al antígeno. Por ejemplo, el desarrollo de ligandos de muy alta afinidad para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (Morris *et al.*, 1998; Kusser, 2000; Els Conrath *et al.*, 2001), de anticuerpos capaces de plegarse y unirse en un ambiente reductor (por ejemplo, en el citoplasma celular) (Pantoliano *et al.*, 1991; Martineau *et al.*, 1998; Martineau y Betton, 1999; Tavladoraki *et al.*, 1999), o el aislamiento de reactivos de afinidad que reconozcan un epitopo específico o una conformación del antígeno (Barbas y Burton, 1996; Kirkham *et al.*, 1999), requieren frecuentemente una caracterización detallada del anticuerpo. Para evaluar eficientemente el funcionamiento de las proteínas modificadas, se necesitaría un instrumento que realice la detección de la unión en tiempo real, y que permita la medición de constantes cinéticas y termodinámicas bajo diferentes condiciones experimentales (por ejemplo, tampón y temperatura) y el estudio de complejos multimoleculares. Esencialmente, todas estas posibilidades las ofrece la tecnología de biosensores (Huber *et al.*, 1999; Van Regenmortel y Choulier, 2001).

2.2 Biosensores

Un biosensor puede definirse como un instrumento que utiliza un elemento biológico como parte íntima de un sensor y que permite la detección rápida y fácil de las interacciones biomoleculares. Esta detección ocurre a dos niveles; uno en el que las propiedades físicas de la macromolécula cambian debido a la unión y otro en el que se produce una señal macroscópica que permite detectar este cambio.

Existen varios tipos de biosensores: sensores físicos (Ramanathan y Danielsson, 2001), electrodos enzimáticos (Guilbault y Kauffmann, 1987; van der Schoot y Bergveld, 1987; Scheller *et al.*, 1988; Kauffmann y Guilbault, 1992; Phadke, 1992; Bakker y Telting-Diaz, 2002), biosensores de células inmovilizadas (Campanella *et al.*, 1995; Pancrazio *et al.*, 1999; Hollis *et al.*, 2000; D'Souza, 2001; Hansen y Sorensen, 2001; Hahn y Touchkine, 2002), inmunosensores (Morgan *et al.*, 1996; Ghindilis *et al.*, 1998; Stefan *et al.*, 2000) y biosensores ópticos (Freitag, 1993; Ramsden, 1997; Leatherbarrow y Edwards, 1999; Cullum y Vo-Dinh, 2000; Brynda *et al.*, 2002; Cooper, 2002; Marazuela y Moreno-Bondi, 2002; Wolfbeis, 2002). Otros biosensores utilizan sondas de ADN como elemento biológico (O'Sullivan, 2002) o incluso organismos multicelulares (Wijesuriya y Rechnitz, 1993; Lagido *et al.*, 2001).

El desarrollo de la mayoría de biosensores requiere la identificación de una macromolécula que proporcione la especificidad deseada (un anticuerpo o una enzima), el descubrimiento de una señal adecuada y la construcción de un detector adaptado a la macromolécula en cuestión. Sin embargo una de las limitaciones que presentaba esta estrategia es que como cada molécula es única se requería mucho tiempo para su desarrollo y optimización (Hellinga y Marvin, 1998).

Por otra parte, la aplicación práctica de los biosensores puede dificultarse por la propensión que tiene el elemento biológico a ser destruido por el elemento que se quiere detectar. Para aplicaciones comerciales un sistema sensor debe ser económico y desechable o ser capaz de operar continuamente por cierto tiempo, pero la mayoría de biosensores son difíciles de producir en gran cantidad y tan solo son estables para realizar unas pocas mediciones. Esto hace que exista un continuo interés en la búsqueda

de nuevas alternativas de biosensores que disminuyan los costos de producción y cuya estabilidad permita muchas mediciones.

Para superar las dificultades que se presentan en el desarrollo, aplicación y producción de los biosensores se han utilizado técnicas de ingeniería de proteínas con las cuales se busca adaptar las propiedades de los sensores a los instrumentos de detección disponibles. Mediante esta aproximación se han generado otro tipo de biosensores con los cuales se busca que la mayoría de las funciones estén agrupadas en una sola molécula.

2.2.1 Biosensores moleculares

La característica distintiva de este tipo de biosensores es que la detección de las sustancias se hace mediante la interacción de una macromolécula y su ligando. La estrategia para obtener un sensor eficiente consistiría en desarrollar un sistema modular en el que la función de transducción de señal permanezca constante a pesar de que el sitio de unión varíe, de manera que se puedan crear biosensores genéricos que permitan usar los mismos instrumentos de detección y a la vez medir una amplia gama de analitos. Lo ideal sería que estos sensores moleculares fueran homogéneos, de manera que no se requiriera un cambio en la composición del sensor. Esto se lograría integrando directamente la función de transducción de señal dentro de la propia macromolécula (Hellinga y Marvin, 1998).

Se han utilizado dos estrategias básicas para diseñar este tipo de biosensores modulares. La primera se basa en la búsqueda de una proteína con una especificidad apropiada a la cual se le introduce una función de transducción de señal. La segunda, consiste en identificar una proteína con una función de transducción de señal particular y bien caracterizada y añadirle sitios de unión apropiados. De las dos, la más utilizada ha sido la primera, en la cual se ha unido covalentemente un grupo indicador, como por ejemplo un fluoróforo, a una proteína con ciertas características de unión específicas (Pollack *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1991; Brune *et al.*, 1994; Gilardi *et al.*, 1994; Post *et al.*, 1994; Marvin *et al.*, 1997). Una alternativa a esta aproximación ha sido la construcción de ensamblajes macromoleculares en los que las funciones de reconocimiento y producción de señal residen en moléculas diferentes. Existen una serie de sensores que se han

construido de esta forma uniendo anticuerpos y péptidos transmembranales formadores de poros (Cornell *et al.*, 1997).

Se han identificado tan sólo unos pocos sistemas que poseen funciones de transducción de señal intrínsecas que pueden ser moduladas por medio de la introducción de un sitio de unión: la α -hemolisina, una proteína transmembranal bacteriana que se ha utilizado con éxito para construir biosensores electroquímicos (Braha *et al.*, 1997), la "green fluorescent protein" (GFP) cuyas propiedades se han aprovechado para construir un sensor óptico (Miyawaki *et al.*, 1997; Romoser *et al.*, 1997) y por último la fosfatasa alcalina (Brennan *et al.*, 1995), la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (Benito *et al.*, 1996), la β -lactamasa (Legendre *et al.*, 1999) y la proteína "tailspike" (TSP) del bacteriófago P22 (Ramírez *et al.*, 1999), la mayoría de las cuales son enzimas a las que se les han insertado epítomos de unión a anticuerpo dentro o cerca de sus sitios activos y cuya función puede modularse por la unión con el ligando, ya sea aumentando o disminuyendo su actividad. Más importante aún, la magnitud de dicha modulación ha mostrado ser dependiente de la concentración del anticuerpo específico utilizado (Brennan *et al.*, 1994; Benito *et al.*, 1996).

2.2.2 β -galactosidasa como elemento transductor

El enzima β -galactosidasa de *Escherichia coli* (β -D-galactósido galactohidrolasa, E.C. 3.2.1.23), codificado por el gen *lacZ*, está compuesto por cuatro subunidades idénticas de 116.353 Da cada una (figura 2) unidas no covalentemente (Mooser, 1992; Jacobson *et al.*, 1994), pero puede presentar formas agregadas de 8, 16 y más monómeros (Marchesi *et al.*, 1969). Aunque cada tetrámero tiene cuatro centros activos (Jacobson *et al.*, 1995), cada uno de ellos está formado por residuos de diferentes monómeros, por lo tanto, solo la forma tetramérica es activa.

Este enzima cataliza la hidrólisis del enlace β 1-4 de la lactosa en galactosa y glucosa, permitiendo así que este azúcar sea utilizado por las células como fuente de carbono en el crecimiento de bacterias heterotróficas (Jacob y Monod, 1961). También cataliza la isomerización de la lactosa (galactosil- β -D-(1,4)-glucopiranososa) a alolactosa (galactosil- β -D-(1,6)-glucopiranososa), principal inductor del operón *lac* de *E.coli* (Huber *et al.*, 1976). Mediante técnicas de mutagénesis dirigida se han podido determinar los

aminoácidos claves en la catálisis, Glu-461 (Bader *et al.*, 1988; Richard *et al.*, 1996), Tyr-503 (Ring *et al.*, 1988), Glu-537 (Gebler *et al.*, 1992) e His-540 (Roth y Huber, 1996). La Gly-794 se ha descrito también como punto de unión al sustrato (Martínez-Bilbao y Huber, 1994). Cada subunidad tiene, además, un sitio de unión a Mg^{2+} o Mn^{2+} , elementos que aumentan significativamente la velocidad de reacción para la mayoría de sustratos. También puede ser activada por Na^{2+} o K^{2+} (Wallenfels y Weil, 1972).

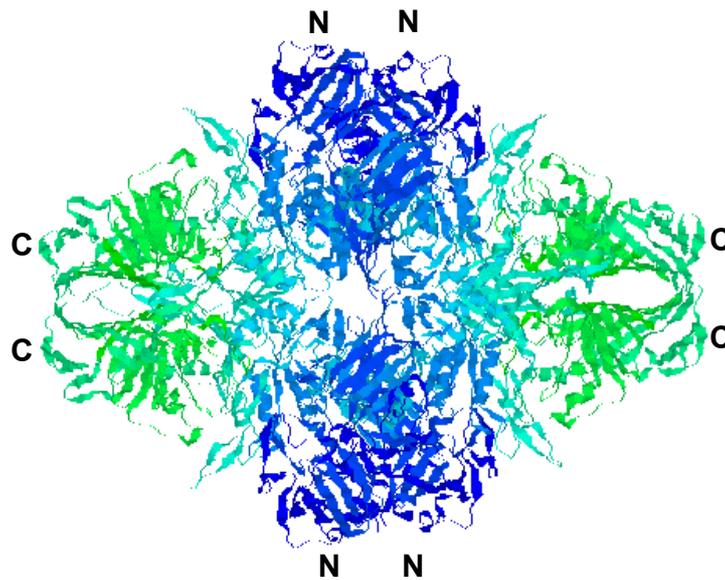


Figura 2. Representación en RasMol® de la estructura tridimensional de la β -galactosidasa, según coordenadas de Jacobson *et al.* (1994). Las letras N y C indican las posiciones aproximadas de los extremos amino y carboxi-terminal respectivamente.

La β -galactosidasa puede además hidrolizar otros sustratos análogos a la lactosa dando productos coloreados fácilmente cuantificables por espectrofotometría o visualización *in situ*, tal es el caso del ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), que da un producto de color amarillo, el (CPRG) rojo clorofenol galactopiranosido con un color rojo y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) de color azul. Esta característica junto con el desarrollo de ensayos enzimáticos sencillos y rápidos (Miller, 1972) ha permitido utilizar *lacZ* como un gen indicador universal tanto en biología molecular como celular (Ullmann, 1992).

Dentro del campo de la ingeniería de proteínas, la β -galactosidasa se ha utilizado también como modelo de proteína portadora para fusiones e inserciones de polipéptidos heterólogos (Silhavy y Beckwith, 1985; Ullmann, 1992). La aparición a principios de los años 80 de vectores con sitios múltiples de clonaje en el extremo 5' del gen *lacZ* (Casadaban *et al.*, 1980), permitieron la creación de proteínas de fusión con la β -galactosidasa. Aunque los dos extremos del enzima se han utilizado para esta finalidad, el extremo amino-terminal ha demostrado ser mucho más tolerante a la delección de pequeños fragmentos y a la fusión de polipéptidos sin una pérdida importante de la actividad (Ullmann, 1992), mientras que el extremo carboxilo es mucho más restrictivo en este aspecto (Corchero *et al.*, 1996; Viaplana *et al.*, 1997, Corchero y Villaverde, 1999).

Estas proteínas recombinantes tienen varias aplicaciones en biotecnología, tales como el seguimiento de la producción de proteínas en bioreactores (Benito *et al.*, 1993), la purificación (Ullmann, 1984) y la mejora de la estabilidad de proteínas heterólogas (Marston, 1986). No obstante, algunas veces se pueden dar casos de proteólisis de proteínas truncadas, mutadas o fusionadas a la β -galactosidasa (Yang *et al.*, 1995; Corchero *et al.*, 1996). En la mayoría de casos la degradación de estas proteínas da lugar a un primer fragmento estable de unos 90 kDa denominado fragmento B (McKnight y Fried, 1983). La sensibilidad de las proteínas β -galactosidasa recombinantes parece depender de la masa molecular del péptido fusionado y de las presiones conformacionales que este dominio heterólogo ejerce sobre la estructura global de la molécula, el cual puede llegar a afectar el proceso de plegamiento (Corchero *et al.*, 1997).

Otra de las aplicaciones que se ha descrito para la β -galactosidasa es la inserción de pequeños péptidos en su superficie para crear enzimas multifuncionales (Baum *et al.*, 1990). De esta forma se ha comprobado que esta proteína puede soportar pequeñas inserciones, aunque en la mayoría de los casos se ha visto que hay una pérdida importante de la actividad específica en las proteínas recombinantes. Existen varios ejemplos de estrategias de inserción, como es el caso de la utilizada por el grupo de Breul y colaboradores (1991), que llevaron a cabo la inserción de oligonucleótidos de 8 bases para comprobar la estructura en diferentes dominios del monómero, y Benito y colaboradores (1994) que localizaron dos sitios permisivos (entre los aminoácidos 275 y 279) en la β -galactosidasa capaces de soportar inserciones hasta de 27 aminoácidos con tan solo una reducción moderada de la actividad específica. La disponibilidad de la

estructura tridimensional (Jacobson *et al.*, 1994) ha ofrecido la posibilidad de llevar a cabo estas inserciones de una forma más racional. A partir de la secuencia, las coordenadas y la visualización de la estructura, es más sencillo buscar los sitios permisivos para péptidos funcionales en lazo expuestos al solvente, tal es el caso del trabajo realizado por Feliu y Villaverde (1998) en el cual se determinó que las posiciones 249 y 581 son sitios permisivos para la inserción de péptidos foráneos.

Por otra parte, se ha reportado que formas inactivas de β -galactosidasa con mutaciones puntuales (AMEF) pueden ser reactivadas de una forma dependiente del título (Celada *et al.*, 1978) cuando se incuban con sueros dirigidos contra la β -galactosidasa salvaje (Rotman y Celada, 1968). Esta activación, que podía obtenerse ya sea con Fab monovalente (Celada *et al.*, 1978) o con anticuerpos monoclonales bivalentes (Accolla *et al.*, 1981), pudo observarse *in vivo* por la producción de scFvs intracelulares en células Lac⁻ (Martineau *et al.*, 1998).

Como se describió anteriormente, para el desarrollo de biosensores modulares es indispensable contar con una molécula capaz de proporcionar la transducción de señal. Dentro de este contexto se puede decir que de todas las características que presenta la β -galactosidasa existen tres muy importantes que la convierten en un posible elemento transductor dentro del diseño de nuevos biosensores, éstas son: la posibilidad de realizar ensayos enzimáticos cuantitativos de una manera sencilla, su tolerancia a fusiones de polipéptidos foráneos y la capacidad de ser reactivada por anticuerpos dirigidos contra los epitopos insertados. En particular, dichos aspectos permitirían utilizar este enzima en la detección de ligandos específicos para los péptidos insertados mediante medición del cambio producido en la actividad enzimática tras la unión péptido-ligando.

En este sistema modular de biosensor haría falta un elemento que ejerza la función de unión al ligando, en la mayoría de los casos se han utilizado péptidos antigénicos cortos que actuarían como elementos sensores que al exponerse en la superficie del enzima son capaces de traducir la interacción molecular con el analito en variaciones detectables de la actividad enzimática.

2.2.3 El sitio antigénico A del virus de la fiebre aftosa (VFA) como péptido funcional

El virus de la fiebre aftosa (VFA) pertenece al género *Aphthovirus* de la familia *Picornaviridae*. Es el agente etiológico responsable de la fiebre aftosa, enfermedad que afecta animales biungulados domésticos (cerdos, cabras, bóvidos y ovejas) y salvajes (ciervos, osos, elefantes, etc), produciendo lesiones vesiculares o aftas en las mucosas (lugar de entrada del virus) y ciertas zonas epiteliales. Aunque la tasa de mortalidad en animales adultos es baja, en animales viejos y muy jóvenes puede llegar al 50%, y la tasa de morbilidad es cercana al 100%, generalmente por lesiones cardíacas irreversibles (Bachrach, 1968). Las pérdidas económicas originadas directa o indirectamente por esta enfermedad hace que sea considerada una de las enfermedades víricas más importantes económicamente.

El VFA, al igual que otros virus RNA, debido al mecanismo de replicación por la RNA polimerasa viral, presenta una elevada tasa de mutación. Este factor, combinado con el gran tamaño de las poblaciones virales, determina una gran heterogeneidad genética dentro de una población, que implica que un virus RNA consista en una mezcla compleja de secuencias genómicas relacionadas pero no idénticas, denominada cuasi-especie viral (Domingo y Holland, 1988).

Como consecuencia de esta elevada variabilidad, el VFA presenta siete serotipos (A, O, C, ASIA, SAT1, SAT2 y SAT3), sin que se detecte inmunidad cruzada entre ellos. Cada serotipo incluye un gran número de variantes y subtipos (Pereira, 1977). También se ha sugerido que cada aislado puede ser no solo genética sino también antigénicamente único (Domingo *et al.*, 1990). Esta gran heterogeneidad antigénica puede convertirse en un obstáculo importante para el control de esta enfermedad.

El genoma viral está constituido por una única molécula de RNA monocatenario de polaridad positiva de unos 8500 nucleótidos de longitud. En su extremo 3' tiene una secuencia poliadenilada de unos 60-80 residuos cuya eliminación conlleva a una pérdida de la capacidad infectiva del virus. En el extremo 5' se encuentra una proteína viral (VPg) unida covalentemente al RNA viral, la cual con una forma uridilada podría tener algún papel como encebador en la síntesis del RNA viral (Wimmer, 1979). Entre la proteína VPg y el comienzo de la región que codifica las proteínas virales hay una región de policitidina

(poli C) de unos 100-200 nucleótidos de longitud. Esta va seguida de una zona formada por una secuencia de 435 bases que permite la traducción independiente de *cap*, denominada IRES (secuencia interna de entrada de ribosomas) (Belsham y Brangwyn, 1990), que se encuentra en una posición inmediatamente anterior al primer codón de iniciación (Figura 3).

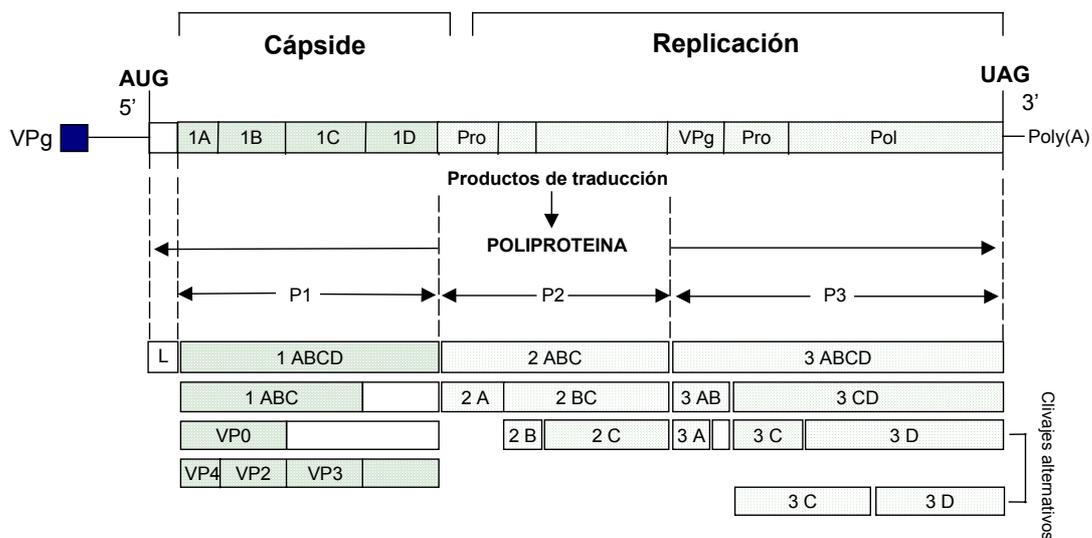


Figura 3. Esquema del genoma del VFA y del procesamiento de las proteínas víricas

La traducción del RNA mensajero comienza a partir de dos codones de iniciación separados por 84 nucleótidos (Beck *et al.*, 1983). Estos codones de iniciación dan lugar a dos proteínas líderes diferentes: Lab y Lb (Clarke *et al.*, 1985; Sangar *et al.*, 1987). Estas proteínas L intervienen en el procesamiento de la proteína celular p220 (componente del complejo de unión del *cap* al ribosoma eucariótico), lo que provoca la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula infectada (Devaney *et al.*, 1988).

La traducción del RNA viral da lugar a una poliproteína que es procesada posteriormente por la acción de 3 proteasas: 3C que interviene en *trans* en la mayor parte de los procesamientos, 2A que podría catalizar en *cis* la separación de 2A/2B y L que autocataliza su separación de la poliproteína (Strebel y Beck, 1986; Palmenberg, 1990). El primer procesamiento de la poliproteína da lugar a la proteína L y a 3 precursores

denominados P1, P2 y P3. La región P1 codifica las proteínas de la cápside viral VP4, VP2, VP3 y VP1. El procesamiento entre P1 y P2 tiene lugar entre 2A y 2B en ausencia de las proteasas L y 3C, y se ha sugerido que la secuencia de unión entre 2A y 2B (NPGP) es inestable y se hidroliza sin ser enzimáticamente proteolizada (Porter, 1993).

La región P2 codifica las proteínas 2B y 2C. No se conoce la función de la proteína 2B. La proteína 2C parece estar implicada en la síntesis del RNA viral y se especula que se podría tratar de una helicasa.

La región P3 codifica las proteínas 3A, 3B, 3C y 3D. Se especula que 3A podría servir de anclaje de 3B a la membrana en forma de 3AB (Porter, 1993), mientras que 3B es la proteína VPg. Esta presenta la particularidad de ser la única proteína precursora de tres proteínas casi iguales y con idéntica función. 3C es la proteasa responsable de la mayoría de los procesamientos de la poliproteína en *cis* y en *trans*, y también del clivaje específico *in vivo* de la histona H3, lo que provoca la inhibición de la transcripción celular (Falk *et al.*, 1990; Tesar y Marquardt, 1990). La proteína 3D forma parte de la RNA polimerasa del virus, probablemente junto con otros factores celulares. Anteriormente se ha demostrado que las partículas virales contienen una molécula de esta proteína, sin que se haya aclarado hasta el momento su papel biológico (Newman *et al.*, 1994). Esta se caracteriza por tener una secuencia muy conservada entre diferentes serotipos (Martínez-Salas *et al.*, 1985) y tiene muchas regiones de homología con diferentes RNA polimerasas de virus de plantas, de animales y bacteriófagos (Kamer y Argos, 1984). La proteína 3D es el antígeno VIA (antígeno asociado a la infección viral) (Cowan y Graves, 1966; Polatnick y Arlinghaus, 1967), que aparece en animales enfermos de fiebre aftosa, y que presenta reacciones cruzadas en todos los serotipos (Newman *et al.*, 1979). La acción de la polimerasa en la replicación del genoma vírico resulta en una elevada tasa de mutación, base de la gran variabilidad genética del VFA.

La cápside vírica presenta simetría icosaédrica con un radio aproximado de 150Å y está compuesta por 60 copias de cuatro proteínas estructurales diferentes, VP1 a VP4. Las proteínas VP1 a VP3 están parcialmente expuestas y conforman la cubierta proteica, tienen un peso molecular aproximado de 35 kDa y presentan una estructura muy similar formada por un cuerpo de ocho láminas β antiparalelas (Rossmann *et al.*, 1985), nombradas alfabéticamente, por convención, de acuerdo con el orden en la secuencia de

aminoácidos. Están conectadas por lazos de longitud variable, que se identifican por las láminas β que unen y que están implicados en la antigenicidad del virus. La partícula viral está formada por 60 protómeros, compuesto cada uno por una molécula de cada proteína estructural. Grupos de 5 protómeros constituyen los 12 pentámeros que se unen para formar la cápside. Los extremos amino-terminales de cada proteína se entrelazan para formar una red en el interior de la cubierta proteica. Cinco extremos amino-terminal de VP3 forman un cilindro helicoidal de cinco láminas β en el interior del virión sobre cada uno de los ejes quíntuples icosaédricos. Este cilindro β estabiliza el pentámero y se cree que es importante para su ensamblaje (Hogle *et al.*, 1985; Arnold *et al.*, 1987).

La proteína VP4 es más pequeña que los otros polipéptidos virales y se encuentra en el interior de la cubierta proteica del virión. Esta proteína presenta una molécula de ácido mirístico en el extremo aminoterminal (Acharya *et al.*, 1989). Esto puede promover su asociación con membranas lipídicas durante el ensamblaje viral o la decapsidación.

Se distinguen tres sitios antigénicos topológica y funcionalmente diferentes:

- un sitio antigénico principal que se denomina sitio A, el cual se localiza en el lazo β G- β H de la proteína VP1 (aminoácidos 140 a 160), que sobresale de la superficie del virión (Strohmaier *et al.*, 1982; Acharya *et al.*, 1989; Lea *et al.*, 1994). El sitio A está formado por múltiples epítomos B continuos (Mateu *et al.*, 1987, 1988, 1989, 1990, 1994 y 1995) y se ha demostrado que es la región más variable de este virus (Feigelstock *et al.*, 1992). Incluye un motivo RGD (Arginina-Glicina-Acido Aspártico) altamente conservado, involucrado en la unión a receptores celulares (Fox *et al.*, 1989; Mason *et al.*, 1994; McKenna *et al.*, 1995; Mateu *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el virus inicia la infección utilizando estos receptores dependientes del motivo RGD, concretamente las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ y $\alpha_v\beta_1$ (Berinstein *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 2000a; Jackson *et al.*, 2000b; Jackson *et al.*, 2002), e incluso se han sugerido otros receptores como heparan sulfato (Jackson *et al.*, 1996; Sa-Carvalho *et al.*, 1997) y la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Amadori *et al.*, 1994; Chambers *et al.*, 1996; Villaverde *et al.*, 1996) como sitios secundarios de unión, esencialmente en virus adaptados al cultivo *in vitro*. Por otra parte, se ha propuesto que debido a que esta zona se encuentra bastante expuesta en la superficie del virión, el VFA poseería una elevada variabilidad en las secuencias adyacentes al motivo RGD (Sobrino *et al.*, 1983; Acharya *et al.*, 1989; Mateu *et al.*, 1990; Taboga *et al.*, 1997) y de este modo podría evadir la respuesta humoral ya que se ha visto

que anticuerpos dirigidos contra esta región son capaces de neutralizar la infectividad del virus (Fox *et al.*, 1989; Novella *et al.*, 1993; Verdaguer *et al.*, 1997).

- el extremo carboxiterminal de la VP1 (residuos 195-209), que en el serotipo O constituye un sitio antigénico independiente y secundario que se denomina sitio C y,
- en el caso del serotipo C se ha descrito otra zona principal denominada sitio antigénico D, formado por epítomos discontinuos que incluyen residuos de las proteínas VP1 (alrededor del aminoácido 193), VP2 (entre los aminoácidos 70 y 80) y VP3 (residuos 58-61) (Lea *et al.*, 1994).

La complejidad biológica que posee la estructura antigénica del sitio A motivó el uso de la proteína VP1 como modelo en la producción de proteínas de fusión a β -galactosidasa. Para llevar a cabo esos estudios, se utilizó como péptido heterólogo una secuencia de 23 aminoácidos (residuos 134 a 158) que incluye el sitio A del clon C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994), correspondiente al lazo β G- β H y que se denomina péptido GH23. Este fragmento incluye también la secuencia conservada, RGD, un motivo que constituye un elemento de reconocimiento en muchos procesos de adhesión celular dependientes de integrinas (Pierschbacher y Ruoslahti, 1987; Ruoslahti y Pierschbacher, 1987) como es el caso de los receptores $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ de la vitronectina (Smith *et al.*, 1990) o el receptor $\alpha_5\beta_1$ de la fibronectina (Pytela *et al.*, 1985).

Muchos patógenos utilizan este motivo RGD para el reconocimiento y unión a la membrana de la célula huésped, como por ejemplo los adenovirus, coxsackievirus A9, echovirus 22 y otros además del VFA. Los motivos RGD se localizan en el extremo de lazos proteicos móviles expuestos al solvente con las cadenas laterales de la Arginina y el Aspártico orientadas hacia el exterior y en direcciones opuestas. La estructura tridimensional del lazo β G- β H no se ha podido posicionar en viriones nativos ya que es invisible por cristalografía de rayos X (Acharya *et al.*, 1989; Logan *et al.*, 1993; Rowlands *et al.*, 1994; Lea *et al.*, 1994), pero se ha resuelto en viriones del serotipo O reducidos químicamente en un puente disulfuro que conecta esta región con la proteína VP2 (Logan *et al.*, 1993; Rowlands *et al.*, 1994). Por otra parte, también se ha resuelto la estructura de un péptido de 15 aminoácidos (denominado A15) que reproduce el sitio A del serotipo C (aislado C-S8c1) unido a un Fab de un anticuerpo neutralizante (Verdaguer *et al.*, 1995). En los dos casos el lazo presenta una estructura muy similar, con una hélice α corta en el extremo carboxilo compuesta por 8 aminoácidos y con los extremos interactuando uno

con el otro dando a la estructura un carácter cíclico. La similitud estructural de este lazo entre serotipos diferentes demuestra la importancia que esta disposición espacial tiene en la función que desarrolla esta región.

Péptidos de entre 16 y 19 aminoácidos que reproducen el lazo β G- β H son capaces de inhibir la infectividad y la unión del VFA a células (Hernández *et al.*, 1996). La importancia que tiene este motivo en el reconocimiento celular se ha confirmado por mutagénesis dirigida (Mason *et al.*, 1994) pero además se ha descrito que el virus es capaz de infectar la célula por una segunda vía independiente, definida como "incremento de la infección dependiente de anticuerpos" (ADE, *antibody-dependent enhancement*), mediante el receptor de la fracción constante del anticuerpo (FcR) (Mason *et al.*, 1994).

Además del motivo RGD, se ha visto que algunos residuos cercanos pueden jugar algún papel en el reconocimiento de ciertos ligandos por diferentes integrinas, posiblemente modulando la conformación de dicho motivo. Tal es el caso del serotipo C que contiene dos leucinas altamente conservadas en las posiciones +1 y +4 en relación al motivo RGD que son críticas para el reconocimiento (Mateu *et al.*, 1996). Otros experimentos llevados a cabo con péptidos sintéticos sugieren también que el extremo carboxi-terminal de la VP1, que en la estructura de la proteína queda cerca del motivo RGD, puede ser necesario para la unión del VFA a la célula huésped (Fox *et al.*, 1989). Estudios recientes describen la posibilidad de que existan lugares alternativos de unión del virus a la célula huésped, ya que viriones con mutaciones en el motivo RGD siguen siendo infectivos y se replican *in vitro* (Martínez *et al.*, 1997), mientras que en otro ejemplo, las sustituciones de determinados residuos permiten el uso de otros receptores, como por ejemplo el sulfato de heparina (Baranowski *et al.*, 1998).

Por tanto, la importancia del fragmento GH23 descrito anteriormente, se centra en dos aspectos. Por un lado el hecho que en esta secuencia se sitúan un gran número de epítomos B superpuestos, de manera que el sitio A constituye el principal sitio antigénico del virus y además se han descrito anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra este sitio A (Baxt *et al.*, 1984). Y por otra parte, péptidos que contienen el motivo RGD promueven la internalización de virus nativos y recombinantes (Wickham *et al.*, 1993; Hart *et al.*, 1994). Por consiguiente, este segmento podría servir tanto para el

reconocimiento celular como para la entrada del virus a las células, lo cual abre la puerta a diferentes aplicaciones como la terapia génica.

Se han empleado varios ligandos con capacidad de unión a células para modificar las propiedades que poseen virus infecciosos recombinantes de dirigirse a las células (Chambers *et al.*, 1996; Nolan, 1997). De una forma similar se han utilizado péptidos sintéticos que contienen el motivo RGD para el transporte dirigido hacia células, de enzimas unidos a ellos (Bekkers *et al.*, 1996). Con base en esto, Villaverde y colaboradores (1998) exploraron la posibilidad de presentar varias copias de un ligando que contenía dicho motivo en la superficie de la β -galactosidasa de *E. coli* y determinaron que se promovía la unión e internalización del enzima quimérico en líneas celulares con diferente especificidad y que el enzima permanecía activo transitoriamente dentro de las células. Estos resultados sugieren que la identificación de sitios permisivos ya sea internos o externos para posicionar péptidos víricos en proteínas permitiría la construcción, mediante técnicas sencillas de DNA recombinante, de proteínas quiméricas funcionales con propiedades de adhesión celular. Esta estrategia podría ser relevante en aplicaciones tales como el marcaje específico de superficies celulares, transporte de toxinas, y terapia de reemplazo proteico. Por otra parte, la fusión de péptidos víricos de adhesión a células con proteínas que se unen a DNA puede proporcionar también vehículos apropiados para terapia génica dirigida, que a su vez constituyen una alternativa al uso de partículas virales completas que se emplean con la misma finalidad.

2.2.4 Las proteínas M278VP1 y JX795A como biosensores

Los diferentes estudios que demostraron la tolerancia de la β -galactosidasa a pequeñas inserciones suscitaron un gran interés en diversos campos de la investigación básica y aplicada debido al alto potencial que estas observaciones podían tener en estudios estructurales y funcionales. Dentro de esta línea de trabajo Benito y colaboradores (1994) generaron, mediante mutagénesis dirigida, una serie de sitios de restricción dentro de la secuencia del gen *lacZ* para poder insertar los oligonucleótidos que codifican el péptido GH23. Mediante esta aproximación pretendían identificar regiones de la β -galactosidasa que por predicción estuvieran localizadas en la superficie de la molécula y que pudieran aceptar grandes inserciones manteniendo parte de la actividad enzimática. De un primer grupo de siete proteínas recombinantes, solo las

inserciones entre los residuos 272 y 288 mantenían la actividad enzimática. Este resultado indicaba la dificultad para encontrar sitios permisivos en una molécula tan compleja como la β -galactosidasa, definiendo estos sitios como aquellos lugares que toleran la inserción de un fragmento relativamente largo sin que haya pérdida de actividad (Hofnung *et al.*, 1988).

Utilizando la estructura tridimensional de la β -galactosidasa, publicada en 1994 (Jacobson *et al.*, 1994), se han podido seleccionar con mayor precisión nuevos sitios de inserción. Se han buscado lazos externos y flexibles donde la inserción esté lo más centrada posible, tratando de evitar la proximidad a residuos con fuertes influencias conformacionales, tales como cisteínas, prolinas o aminoácidos hidrofóbicos. Siguiendo esta estrategia, se han generado una serie de enzimas recombinantes con inserciones en las posiciones 249, 279, 581, 772 y 795 de la β -galactosidasa. También se han hecho fusiones en el extremo C-terminal para usarlas como control (Feliu y Villaverde, 1998). Todas estas construcciones eran solubles y presentaban el péptido viral expuesto al solvente, tal como se demostró por ELISA de competición utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra GH23 (Feliu y Villaverde, 1998; Feliu *et al.*, 1998a).

Los monómeros quiméricos se asociaban para formar tetrámeros activos, y en el caso de las proteínas JX8CA y JX249A poseían actividades específicas similares a las de la proteína LACZ (una versión de la β -galactosidasa salvaje a la cual le faltan los primeros 8 aminoácidos del extremo N-terminal), y en el caso de la proteína M278VP1 una actividad 15 veces menor. La presencia del péptido vírico afectaba básicamente la constante catalítica (k_{cat}), excepto en el caso de las proteínas JX772A, JX795A, M275VP1 y M278VP1, en las cuales se veían afectadas tanto la k_{cat} como la constante de afinidad (K_m) (Feliu y Villaverde, 1998). La mayoría de proteínas que mostraban un cambio en la afinidad por el sustrato eran aquellas que llevaban una inserción cercana al sitio activo (Jacobson *et al.*, 1994). La presencia del fragmento peptídico afectaba la estabilidad de estas proteínas recombinantes pero no afectaba la estructura completa como se observó por análisis de fluorescencia a longitudes de onda de máxima emisión (λ_{max}) (Feliu y Villaverde, 1998). Esto indicaba que los sitios de inserción seleccionados eran adecuados.

La región de la β -galactosidasa comprendida entre los aminoácidos 272 a 288 participa en el sitio activo del enzima y está involucrada en los contactos monómero-

monómero a través de un lazo que sobresale y se extiende a través de la interfase de activación hacia el monómero vecino (Jacobson *et al.*, 1994). La alta sensibilidad a desnaturalización que muestran las proteínas con inserciones en las posiciones 275 y 278, así como su baja actividad (Feliu y Villaverde, 1998), confirma el papel crítico que juega esta región en el desempeño del enzima. Sin embargo, y a pesar de la importancia que tiene esta zona en la estructura y actividad de la β -galactosidasa, se ha visto que inserciones dentro de esta región pueden dar como resultado enzimas funcionales. Esto se pudo comprobar posteriormente en un trabajo por medio del cual se exploró la capacidad que tenía esta región para soportar la inserción de péptidos antigénicos específicos de HIV-1 (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001). En dicho trabajo se introdujeron varios segmentos peptídicos (15-45 aminoácidos de longitud), incluyendo epitopos B de la proteína de la cubierta del HIV-1, en el lazo que comprende los aminoácidos 272-288 y/o en el lazo 794-803; de este modo los péptidos quedaban en contacto directo con los residuos que forman el sitio activo. Se observó que los enzimas obtenidos presentaban cantidades detectables de actividad β -galactosidasa y además, se pudo determinar que el tamaño del péptido insertado influía en los parámetros enzimáticos.

Estas proteínas recombinantes muestran un carácter multifuncional que se confirma por la capacidad que tienen de hidrolizar sustratos de la β -galactosidasa y simultáneamente unir, ya sea anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio A o células de mamífero que son infectadas normalmente por el VFA (Feliu *et al.*, 1998a), y en el caso de las proteínas con inserciones de péptidos de HIV, unir anticuerpos dirigidos contra el epítipo P1 (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001).

Utilizando estas proteínas recombinantes se ha estudiado el reconocimiento por anticuerpos del péptido GH23 dependiendo del sitio de inserción en la superficie de la β -galactosidasa. En algunos casos, las proteínas eran capaces de reproducir la antigenicidad del virus intacto incluso mejor que el péptido viral acoplado a hemocianina (Benito *et al.*, 1995; Feliu *et al.*, 1998a), lo cual indica que la exposición selectiva de péptidos es una aproximación válida para reproducir la conformación del lazo G-H de la proteína VP1. Por tanto, estas proteínas no solo podrían convertirse en elementos con una función de sensor biológico para la detección de anticuerpos (Benito *et al.*, 1996; Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b) sino además en sistemas que permitan encontrar entornos apropiados para la presentación de péptidos dentro de la compleja variedad de

ambientes moleculares ofrecidos por la proteína portadora, lo cual daría como resultado una mejora en el comportamiento antigénico del epítipo (Benito *et al.*, 1995; Feliu *et al.*, 2000a).

Se ha descrito que la unión de un anticuerpo puede inducir cambios conformacionales en las proteínas, lo cual puede afectar también su función (Celada y Strom, 1972; Poignard *et al.*, 1996). Se han llevado a cabo estudios utilizando las β -galactosidasas recombinantes descritas anteriormente, para determinar si la unión específica de anticuerpos dirigidos contra el péptido insertado podía alterar la actividad del enzima. Para esto se evaluaba la hidrólisis del sustrato en presencia o ausencia de anticuerpos (Benito *et al.*, 1996; Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b). Mientras que la mayoría de proteínas tan solo mostraron un pequeño aumento en su actividad, las proteínas M278VP1 y JX795A alcanzaron hasta un 200% de incremento respecto al ensayo sin anticuerpos. Estos resultados se obtenían utilizando tanto anticuerpos monoclonales como sueros de cobayas. Esto indica que la modulación no es una propiedad particular de un anticuerpo, ya que el uso de diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes epítopos del sitio A ejerce el mismo efecto sobre la actividad de la β -galactosidasa.

Por otra parte, se ha visto que esta reactivación no se produce en ninguna de las construcciones cuando se utilizan anticuerpos no relacionados con el péptido insertado. Además la actividad del enzima nativo permanece inalterada cuando se utilizan los anticuerpos monoclonales anti-GH23. En estudios anteriores se había descrito que anticuerpos anti- β gal protegían contra la denaturación de la enzima por calor (Celada y Strom, 1972). Sin embargo, en los ensayos realizados con estas dos proteínas no se observó un cambio en la actividad enzimática durante la incubación sin anticuerpos a 28°C, lo que indicaría que la protección de la inactivación proteica debida a la unión del anticuerpo no parece ser la explicación para la activación de las β -galactosidasas recombinantes (Benito *et al.*, 1996). En estudios posteriores realizados con otra serie de β -galactosidasas recombinantes que llevaban múltiples inserciones peptídicas cercanas al sitio activo se han detectado cambios en la estabilidad del enzima tras la unión del anticuerpo y que parecen complementar o acentuar la modificación alostérica del sitio activo mediada por el anticuerpo (Feliu *et al.*, 2002).

El uso de estas proteínas recombinantes como biosensores para la detección de anticuerpos específicos contra el VFA es posible ya que cumplen los principales requisitos de un biosensor; cuentan con un elemento de unión y un transductor de señal, y además la intensidad de la señal producida depende de la concentración de anticuerpo, lo que permite a la vez calcular el título. Sin embargo, la señal enzimática que se había obtenido hasta ahora con estos enzimas capaces de ser activados por anticuerpos difícilmente alcanzaba valores cercanos a un 200% de su actividad basal (Benito *et al.*, 1996; Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b; Ferrer-Miralles *et al.*, 2000, 2001), lo cual representaba una limitación en la flexibilidad y sensibilidad de todo el sistema analítico. Por este motivo, en estudios posteriores se ha adaptado este sistema sensor basado en β -galactosidasa para aprovechar su potencial de detección mediante la optimización de las condiciones de reacción para la detección de anticuerpos anti-VFA. El resultado indicaba que bajas cantidades de enzima combinadas con altas concentraciones de sustrato aumentaban la señal enzimática producida por la unión al anticuerpo y por otra parte, el tiempo de duración del proceso total de detección podía acortarse manteniendo un importante nivel de sensibilidad, lo que lo hace aún más apropiado para realizar ensayos homogéneos automatizados. Dichas observaciones no solo sustentan la utilidad de estos sensores moleculares basados en la β -galactosidasa sino que también prueban el elevado potencial y dinamismo que poseen (Cazorla *et al.*, 2002).

2.2.5 Modelos sobre mecanismos de reactivación enzimática

Una característica importante de los enzimas recombinantes M278VP1 y JX795A es que la inserción del péptido se hizo cerca al sitio activo de la proteína, específicamente entre los aminoácidos 279 y 280 para el caso de M278VP1 (Benito y Villaverde, 1994), en un lazo que sobresale y se extiende hacia el sitio activo del monómero vecino, formando la interfase activadora entre los componentes del dímero (Jacobson *et al.*, 1994); y entre los aminoácidos 795 y 796 para la JX795A, los cuales se encuentran dentro de un lazo expuesto al solvente que abarca la Gly₇₉₄, un residuo que está involucrado en la unión al sustrato (Martínez-Bilbao y Huber, 1994). Esta ubicación del péptido produjo una disminución en la actividad específica de estas proteínas (Benito *et al.*, 1996; Feliu y Villaverde, 1998). El análisis de las constantes enzimáticas en presencia o ausencia de anticuerpos reveló que el efecto de la unión del anticuerpo es diferente dependiendo de la proteína estudiada. Mientras que para la M278VP1, la unión del anticuerpo mejora su

afinidad por sustratos de la β -galactosidasa, es decir, la K_m disminuye significativamente mientras que la k_{cat} permanece inalterada, en el caso de la JX795A el valor de la k_{cat} aumenta. No obstante, en ninguna de las dos proteínas se ha observado una especificidad por el sustrato (k_{cat}/K_m) igual a la de la proteína sin anticuerpo.

En los dos casos se ha propuesto que la unión del anticuerpo podría inducir cambios conformacionales en el sitio activo o en sus alrededores, que llevan a un aumento de la actividad. En la proteína M278VP1 esta modificación puede permitir una mayor difusión del sustrato y por lo tanto un aumento en la unión (Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b), reduciendo los impedimentos estéricos que existen debido a la presencia del péptido vírico en la interfase de activación cercana al sitio activo. Por el contrario, en la proteína JX795A la inserción del fragmento VP1 cerca de un residuo involucrado en la función catalítica del enzima (Martínez-Bilbao y Huber, 1994) puede causar una reducción del valor de la k_{cat} , que puede ser recuperado parcialmente por cambios estructurales promovidos por la unión del anticuerpo. No obstante, en estudios realizados posteriormente encaminados a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta enzimática se propuso que el valor de modulación depende directamente del cociente entre la k_{cat} de la proteína recombinante y la k_{cat} de la enzima parental. Además, se observó que había una relación lineal entre el grado de modulación y la modificación en la k_{cat} debido a la inserción del péptido. De este modo, los péptidos insertados en lazos expuestos al solvente causan una disminución en la actividad enzimática de la proteína mutante que puede ser recuperada parcialmente tras la unión de anticuerpos específicos. Los cambios estructurales que se dan sobre el péptido insertado tras la unión del anticuerpo pueden evidenciar una pérdida parcial de su flexibilidad que se transmite al sitio catalítico del enzima. En conclusión, el impacto que las inserciones peptídicas tienen sobre la k_{cat} del enzima puede dar una idea sobre la respuesta de estos enzimas a anticuerpos, ya que el adecuado funcionamiento de los biosensores enzimáticos depende de la modificación de la k_{cat} (Ferrer-Miralles *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha llevado a cabo el análisis de la unión de anticuerpos y la modulación enzimática en el contexto de la conformación local de los péptidos. Se puede decir que para una apropiada respuesta de un sensor se requiere que los péptidos heterólogos sean accesibles a los anticuerpos anti-epítipo. Cuando se estudió la

modulación de las proteínas recombinantes que llevaban insertados péptidos del HIV-1 en las posiciones 278 y 795 se observó que en el caso de la posición 278 una longitud del péptido de alrededor de 25 residuos podría ser crítica para la reactivación de enzimas modificados en esta posición, mientras que la inserción de segmentos más largos podría tener un impacto demasiado grande en las constantes enzimáticas de la β -galactosidasa para ser restauradas por la unión de anticuerpos. En cuanto a la posición 795, el tamaño crítico del péptido podría estar alrededor de 35 aminoácidos, y se observó un incremento gradual del nivel de reactivación a medida que aumentaba el tamaño del péptido. Al comparar la modulación de actividad entre las proteínas M278VP1 y JX795A y las proteínas que llevaban insertados péptidos de HIV-1 en las mismas posiciones se observaron diferencias en los niveles de reactivación y se propuso que dichas diferencias podrían deberse a factores tales como la fuerza de la unión molecular de los anticuerpos monoclonales correspondientes, la exposición del epítopo al solvente y los cambios conformacionales en el epítopo ya sea tras la inserción o después de la unión del anticuerpo (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001).

Como se indicó anteriormente, los datos experimentales han mostrado que las propiedades enzimáticas, la unión del anticuerpo y el factor de reactivación dependen de los péptidos antigénicos insertados en las β -galactosidasas. Para entender un poco mejor el mecanismo de estos procesos se intentó estudiar la estructura tri-dimensional de algunas de estas β -galactosidasas modificadas y aunque no se pudo llevar a cabo la cristalización de las proteínas, se recurrió al uso de modelos moleculares que permitieron construir estructuras tri-dimensionales de dichas proteínas (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que el lazo 794-803 no contribuye directamente a la forma del sitio activo pero interacciona con residuos que se encuentran en ese sitio, y sustituciones en la Gly-794 afectan la unión de los sustratos, es posible esperar que inserciones peptídicas en la posición 795 alteren el valor de K_m de la proteína. Mediante los modelos moleculares se ha podido deducir que la propensión que tienen las secuencias insertadas en la posición 795 de adoptar una estructura secundaria en hélice α se correlaciona con una mayor unión de las proteínas al sustrato. Cuando esta tendencia no existe o es muy baja, el valor de K_m de las proteínas recombinantes vuelve a ser el mismo que el del enzima nativo. Es probable que la presencia de una estructura secundaria definida induzca una rigidez local en esta región de la proteína, ayudando de este modo a reforzar la afinidad de la cavidad del sitio activo por el sustrato (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001). Esto quiere decir

que el efecto en la unión del sustrato no dependería solo del tamaño del péptido insertado sino también de la capacidad que éste tenga para conservar su estructura secundaria local, capacidad que dependería de la secuencia de aminoácidos. Adicionalmente, se ha estudiado la relación entre las estructuras de los enzimas modificados y los valores de k_{cat} y se observó que en los enzimas modificados aparecían nuevas interacciones entre los residuos de los insertos y residuos importantes para la tasa de catálisis. Es significativo que el aumento en el número de residuos catalíticos involucrados en contactos con el péptido insertado concuerda con una disminución de los valores de k_{cat} . Por tanto, se ha planteado que estas dos propiedades, tamaño y estructura secundaria del péptido insertado, pueden afectar la conformación local de la proteína cerca al sitio activo y modificar su actividad catalítica. Los estudios con los modelos permitieron sugerir además, que no sólo la conformación del epítipo sino también su exposición al solvente serían factores importantes para el reconocimiento por anticuerpos (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001).

Continuando con los estudios por medio de los cuales se buscaba entender mejor las bases de la reactivación enzimática, se evaluó la unión bivalente con el fin de determinar si era una condición necesaria para que se llevara a cabo esta modulación de la actividad. Para esto se utilizaron un anticuerpo monoclonal completo denominado SD6 y su fragmento Fab. SD6 es una inmunoglobulina del isotipo IgG1, que está dirigida contra el VFA C-S8c1 y reconoce un epítipo continuo en el lazo GH de la proteína VP1 de dicho virus. Se seleccionó este anticuerpo ya que ha sido ampliamente caracterizado, se conocía su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional. Por otra parte, se contaba con información estructural más detallada sobre la interacción del anticuerpo con el sitio antigénico derivada de los estudios de Verdaguer y colaboradores (1995) mediante los cuales lograron elucidar la estructura de un complejo entre el fragmento Fab del SD6 y un péptido de 15 aminoácidos que representaba el lazo GH de la proteína VP1. En dicho trabajo se pudo determinar que en ese complejo, el motivo RGD y algunos residuos circundantes participaban directamente en las interacciones con el anticuerpo. Adicionalmente, estudios bioquímicos y de criomicroscopía electrónica han mostrado que el mAb SD6 es un neutralizador efectivo que se une de forma monovalente a las partículas víricas sin causar agregación de viriones y se ha determinado que el mecanismo de neutralización se basa en el bloqueo de la unión de las partículas víricas a las células (Verdaguer *et al.*, 1997).

En los ensayos que se llevaron a cabo con las β -galactosidasas recombinantes y el anticuerpo monoclonal SD6 y su fragmento Fab, se observó que en el caso de la proteína M278VP1 la reactivación era dependiente de la unión del anticuerpo monoclonal completo, es decir, se requería una interacción bivalente para su reactivación, a diferencia de la proteína JX795A que respondía de una manera similar tanto al anticuerpo monoclonal como al fragmento Fab (Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b). Según estos resultados se han propuesto dos tipos diferentes de mecanismos de reactivación. La clase I que estaría representada por la proteína M278VP1, en la cual se observa una disminución en el valor de la K_m y se requiere una unión bivalente para que haya reactivación. Y por otro lado, la clase II, representada por la proteína JX795A, cuya reactivación es independiente de la valencia de la unión al anticuerpo y que además muestra un incremento en la constante catalítica k_{cat} . Sin embargo, estas clasificaciones dependen del anticuerpo analizado, ya que se ha visto que la proteína JX795A incubada con suero de cobaya presenta una reactivación con características de las dos clases (Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b; Feliu *et al.*, 2000c).

Se han descrito además otros tipos de mecanismos de reactivación por medio de los cuales el anticuerpo permitiría la formación de tetrámeros a partir de dímeros (De Macario *et al.*, 1978). En todo caso, esta no sería una explicación a lo observado con las proteínas M278VP1 y JX795A ya que estas son activas incluso en ausencia de anticuerpos, indicando la presencia de tetrámeros. Esto se comprobó con los resultados obtenidos con una de las proteínas que llevaba la inserción del péptido de HIV-1, en este caso midiendo la actividad y modulación de la actividad por anticuerpos monoclonales, se observó que ciclos de congelación-descongelación repetitivos daban como resultado una disminución de los valores absolutos de la actividad pero la tasa de activación permanecía sin cambios. Esto confirma que la reactivación mediada por anticuerpos ocurre en el tetrámero biológicamente activo y excluye la posibilidad de que la reactivación ocurra por una tetramerización forzada debida a la unión del anticuerpo (Ferrer-Miralles *et al.*, 2001).

Existirían dos mecanismos no excluyentes que podrían explicar la activación. 1) desplazamiento del equilibrio monómero-tetrámero, y 2) modificaciones conformacionales cercanas al sitio activo. La dependencia de la unión bivalente para la reactivación en la proteína M278VP1 favorecería la primera hipótesis (Feliu *et al.*, 1998b; Feliu *et al.*, 2000b). Sin embargo, el cambio de los parámetros enzimáticos en los dos tipos de

sensores y el hecho que la proteína JX795A puede ser reactivada tanto por anticuerpos monoclonales como por sus Fabs respectivos, reforzaría la idea sobre cambios en la conformación del enzima debidos a la unión del anticuerpo. Todo lo anterior indicaría que la unión de anticuerpos anti-GH23 puede alterar la conformación de los enzimas mutantes dando lugar a un aumento de la tasa de catálisis o a una mayor accesibilidad del sustrato.

Los datos obtenidos hasta el momento con esta aproximación a la generación de biosensores basados en β -galactosidasa abre una serie de posibilidades y genera interrogantes que motivan el estudio e interpretación de nuevos y más amplios alcances de la reactivación. Por otra parte, constituye un modelo para evaluar y determinar si pueden obtenerse nuevos enzimas recombinantes con inserciones de péptidos y secuencias de diferentes longitudes que también puedan ser reactivadas y que puedan generar más información sobre las bases del fenómeno de reactivación y la implicación que tienen en éste los diferentes tipos de unión receptor-ligando.

2.3 Bibliografía

Accolla, R.S., Cina, R., Montesoro, E. y Celada, F. (1981). Antibody-mediated activation of genetically defective *Escherichia coli* beta-galactosidases by monoclonal antibodies produced by somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2478-2482.

Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D. y Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, **337**, 709-716.

Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S. y Tsien, R.Y. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature*, **349**, 694-697.

Amadori, M., Berneri, C. y Archetti, I.L. (1994). Immunogenicity of foot-and-mouth disease virus grown in BHK-21 suspension cells. Correlation with cell ploidy alterations and abnormal expression of the $\alpha_5\beta_1$ integrin. *Vaccine*, **12**, 159-166.

Arnold, E., Luo, M., Vriend, G., Rossmann, M.G., Palmenberg, A.C., Parks, G.D., Nicklin, M.J.H. y Wimmer, E. (1987). Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 21-25.

Bachrach, H.L. (1968). Foot-and-mouth disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, **22**, 201-244.

Bader, D.E., Ring, M. y Huber, R.E. (1988). Site-directed mutagenic replacement of glu-461 with gln in beta-galactosidase (*E. coli*): evidence that glu-461 is important for activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 301-306.

Bakker, E. y Telting-Diaz, M. (2002). Electrochemical sensors. *Anal. Chem.*, **74**, 2781-2800.

Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruiz-Jarabo, C.M., Beck, E. y Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.*, **72**, 6362-6372.

Barbas, C.F. III y Burton, D.R. (1996). Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies. *Trends Biotechnol.*, **14**, 230-234.

Baum, E.Z., Beberitz, G.A. y Gluzman, Y. (1990). Beta-galactosidase containing a human immunodeficiency virus protease cleavage site is cleaved and inactivated by human immunodeficiency virus protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 10023-10027.

Baxt, B., Morgan, D.O., Robertson, B.H. y Timpone, C.A. (1984). Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J. Virol.*, **51**, 298-305.

Beck, E., Forss, S., Strebel, K., Cattaneo R. y Feil G. (1983). Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7873-7885.

Bekkers, A.C., Slotboom, A.J., van Willigen, G., Akkerman, J.W. y Verheij, H.M. (1996). Targeting of porcine pancreatic phospholipase A2 to human platelets. Introduction of an RGD sequence and acyl-group by chemical modification. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 70-76.

- Belsham, G.J. y Brangwyn, J.K. (1990). A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J. Virol.*, **64**, 5389-5395.
- Benito, A., Valero, F., Lafuente, J., Vidal, M., Cairo, J., Sola, J. y Villaverde, A. (1993). Uses of beta-galactosidase tag in on-line monitoring production of fusion proteins and gene expression in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 66-71.
- Benito, A. y Villaverde, A. (1994). Insertion of a 27 amino acid viral peptide in different zones of *Escherichia coli* beta-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 beta-galactosidase surface. *Biotechnology*, **13**, 801-804.
- Benito, A., Feliu, J.X. y Villaverde, A. (1996). Beta-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.
- Better, M., Chang C.P., Robinson, R.R. y Horwitz, A.H. (1988). *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*, **240**, 1041-1043.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. y Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, **242**, 423-426.
- Braha, O., Walker, B., Cheley, S., Kasianowicz, J.J., Song, L., Gouaux, J.E. y Bayley, H. (1997). Designed protein pores as components for biosensors. *Chem. Biol.*, **4**, 497-505.
- Brennan, C.A., Christianson, K., Surowy, T. y Mandrecki, W. (1994). Modulation of enzyme activity by antibody binding to an alkaline phosphatase-epitope hybrid protein. *Protein Eng.*, **7**, 509-514.
- Brennan, C.A., Christianson, K., La Fleur, M.A. y Mandrecki, W. (1995). A molecular sensor system based on genetically engineered alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5783-5787.
- Breul, A., Kuchinke, W., von Wilcken-Bergmann, B. y Muller-Hill, B. (1991). Linker mutagenesis in the *lacZ* gene of *Escherichia coli* yields variants of active beta-galactosidase. *Eur. J. Biochem.*, **195**, 191-194.
- Brune, M., Hunter, J.L., Corrie, J.E. y Webb, M.R. (1994). Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry*, **33**, 8262-8271.
- Brynda, E., Houska, M., Brandenburg, A. y Wikerstal, A. (2002). Optical biosensors for real-time measurement of analytes in blood plasma. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 665-675.
- Campanella, L., Favero, G. y Tomassetti, M. (1995). Immobilised yeast

cells biosensor for total toxicity testing. *Sci. Total Environ.*, **171**, 227-234.

Casadaban, M.J., Chou, J. y Cohen, S.N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.*, **143**, 971-980.

Cazorla, D., Feliu, J.X., Ferrer-Miralles, N. y Villaverde, A. (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., Strom, R. y Bodlund, K. (1978). The Operon. Miller, J.H. y Reznikoff, W.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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.

Clarke, B.E., Sangar, D.V., Burroughs, J.N., Newton, S.E., Carroll, A.R. y Rowlands, D.J. (1985). Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein in vivo. *J. Gen. Virol.*, **66**, 2615-2626.

Cooper, M.A. (2002). Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 515-528.

Corchero, J.L., Viaplana, E., Benito, A. y Villaverde, A. (1996). The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *J. Biotechnol.*, **48**, 191-200.

Corchero, J.L., Cubarsí, R., Enfors, S. y Villaverde, A. (1997). Limited *in vivo* proteolysis of aggregated proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 325-330.

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

Cornell, B.A., Braach-Maksvytis, V.L., King, L.G., Osman, P.D., Raguse, B., Wieczorek, L. y Pace, R.J. (1997). A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, **387**, 580-583.

Cowan, K.M. y Graves, J.H. (1966). A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology*, **30**, 528-540.

Cullum, B.M. y Vo-Dinh, T. (2000). The development of optical nanosensors for biological measurements. *Trends. Biotechnol.*, **18**, 388-393.

De Macario, E.C., Ellis, J., Guzman, R. y Rotman, B. (1978). Antibody-mediated activation of a defective beta-D-galactosidase: dimeric form of the activatable mutant enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 720-724.

Demartis, S., Huber, A., Viti, F., Lozzi, L., Giovannoni, L., Neri, P., Winter, G. y Neri, D. (1999). A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, **286**, 617-633.

Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E. y Grubman, M.J. (1988). Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.*, **62**, 4407-4409.

Domingo, E. y Holland, J.J. (1988). RNA genetics. Vol.3, pp: 3-36. CRC Press Inc.

Domingo, E., Mateu, M.G., Martínez, M.A., Dopazo, J., Moya, A. y Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. Applied virology research. Vol. 2, pp. 233. Ed.: Kurstack, E., Marusyk, R.G., Murphy, F.A. y Van Regenmortel, M.H.V. Plenum Publishing Corp.

D'Souza, S.F. (2001). Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 337-353.

Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L. and Muyldermans, S. (2001). Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7346-7350.

Erickson, J.W. y Abdel-Meguid, S. (1994). Protein engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **5**, 339-342.

Falk, M.M., Grigera, P.R., Bergmann, I.E., Zibert, A., Multhaup, G. y Beck, E. (1990). Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J. Virol.*, **64**, 748-756.

Fanger, M.W., Segal, D.M. y Romet-Lemonne, J.L. (1991). Bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity. *Immunol. Today*, **12**, 51-54.

Feigelstock, D., Mateu, M.G., Piccone, M.E., De Simone, F., Brocchi,

E., Domingo, E. y Palma, E.L. (1992). Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. Gen. Virol.*, **73**, 3307-3311.

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

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

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. y Villaverde, A. (2000c). β -Galactosidase-based enzymatic biosensors. Recent research developments in biotechnology & bioengineering. Vol 3, pp. 21. Ed.: Pandalai, S.G. y Gayathri, A. Research Signpost, India.

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-Miralles, 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.

Fersht, A. y Winter G. (1992). Protein engineering. *Trends. Biochem. Sci.*, **17**, 292-295.

Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D.J. y Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J. Gen. Virol.*, **70**, 625-637.

Freitag, R. (1993). Applied biosensors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 75-79.

Gebler, J.C., Aebersold, R. y Withers, S.G. (1992). Glu-537, not Glu-461, is the nucleophile in the active site of (LacZ) beta-galactosidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 11126-11130.

Ghindilis, A.L., Atanasov, P., Wilkins, M. y Wilkins, E. (1998). Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 113-131.

Gilardi, G., Zhou, L.Q., Hibbert, L. y Cass, A.E. (1994). Engineering the maltose binding protein for reagentless fluorescence sensing. *Anal. Chem.*, **66**, 3840-3847.

Greisman, H.A. y Pabo, C.O. (1997). A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*, **275**, 657-661.

Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zacco, M., Gherardi, E. y Winter, G. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.*, **13**, 3245-3260.

Guilbault, G.G. y Kauffmann, J.M. (1987). Enzyme-based electrodes as analytical tools. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **9**, 95-113.

Hahn, K. y Touthkine, A. (2002). Live-cell fluorescent biosensors for activated signaling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 167-172.

Hansen, L.H. y Sorensen, S.J. (2001). The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. *Microb. Ecol.*, **42**, 483-494.

Harlow, E. y Lane, D. (1988). Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Hart, S.L., Knight, A.M., Harbottle, R.P., Mistry, A., Hunger, H.D., Cutler, D.F., Williamson, R. y Coutelle, C. (1994). Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12468-12474.

- Hellinga, H.W. y Marvin, J.S. (1998). Protein engineering and the development of generic biosensors. *Trends Biotechnol.*, **16**, 183-189.
- Hernández, J., Valero, M.L., Andreu, D., Domingo, E. y Mateu, M.G. (1996). Antibody and host cell recognition of foot-and-mouth disease virus (serotype C) cleaved at the Arg-Gly-Asp (RGD) motif: a structural interpretation. *J. Gen. Virol.*, **77**, 257-264.
- Hofnung, M., Bedouelle, H., Boulain, J., Clement, J., Charbit, A., Duplay, P., Gehring, K., Martineau, P., Saurin, W. y Szmelcman, S. (1988). Genetic approaches to the study and the use of proteins: random point mutations and random linker insertions. *Bull. Inst. Pasteur*, **86**, 95-101.
- Hogle, J.M., Chow, M. y Filman, D.J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, **229**, 1358-1365.
- Hollis, R.P., Killham, K. y Glover, L.A. (2000). Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to eukaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1676-1679.
- Huber, A., Demartis, S. y Neri, D. (1999). The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *J. Mol. Recognit.*, **12**, 198-216.
- Huber, R.E., Kurz, G. y Wallenfels K. (1976). A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, **15**, 1994-2001.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E. y Crea, R. (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.
- 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., Blakemore, W., Newman, J.W., Knowles, N.J., Mould, A.P., Humphries, M.J. y King, A.M. (2000a). Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin $\alpha_5\beta_1$: influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding. *J. Gen. Virol.*, **81**, 1383-1391.
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W. y King, A.M. (2000b). The epithelial integrin $\alpha_v\beta_6$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, **74**, 4949-4956.
- Jackson, T., Mould, A.P., Sheppard, D. y King, A.M. (2002). Integrin $\alpha_5\beta_1$ is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, **76**, 935-941.
- Jacob, F. y Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, **3**, 318-356.
- Jacobson, R.H., Zhang, X.J., DuBose, R.F. y Matthews, B.W. (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature.*, **369**, 761-766.
- Jacobson, R.H., Kuroki, R., Weaver, L.H., Zhang, X.J. y Matthews, B.W. (1995). Glycosidases, large and small - T4 lysozyme and *Escherichia coli*

β -galactosidase. ACS *Symposium Series*, **618**, 38-50.

Jestin, J.L., Kristensen, P. y Winter, G. (1999). A method for the selection of catalytic activity using phage display and proximity coupling. *Angew. Chem.*, **111**, 1196-1200.

Kamer, G. y Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7269-7282.

Kauffmann, J.M. y Guilbault, G.G. (1992). Enzyme electrode biosensors: theory and applications. *Methods Biochem. Anal.*, **36**, 63-113.

Kirkham, P.M., Neri, D. y Winter, G. (1999). Towards the design of an antibody that recognises a given protein epitope. *J. Mol. Biol.*, **285**, 909-915.

Kossiakoff, A. y Smith, M. (1993). Protein engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 385-391.

Kusser, W. (2000). Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J. Biotechnol.*, **74**, 27-38.

Lagido, C., Pettitt, J., Porter, A.J., Paton, G.I. y Glover, L.A. (2001). Development and application of bioluminescent *Caenorhabditis elegans* as multicellular eukaryotic biosensors. *FEBS Lett.*, **493**, 36-39.

Lea, S., Hernandez, J., Blakemore, W., Brocchi, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D. y Mateu, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*, **2**, 123-139.

Leatherbarrow, R.J. y Edwards, P.R. (1999). Analysis of molecular

recognition using optical biosensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 544-547.

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

Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., Rowlands, D., Stuart, D. y Fry, E. (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus. *Nature*, **362**, 566-568.

Lowman, H.B. y Wells, J.A. (1993). Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.*, **234**, 564-578.

Marazuela, D. y Moreno-Bondi, M.C. (2002). Fiber-optic biosensors: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 664-682.

Marchesi, S.L., Steers, E. Jr. y Shifrin, S. (1969). Purification and characterization of the multiple forms of beta-galactosidase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 20-34.

Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. y Winter, G. (1991). By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, **222**, 581-597.

Marston, F.A. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1-12.

Martineau, P., Jones, P. y Winter, G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.*, **280**, 117-127.

Martineau, P. y Betton, J.M. (1999). In vitro folding and thermodynamic stability of an antibody fragment selected in vivo for high expression levels in *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Mol. Biol.*, **292**, 921-929.

Martínez, M.A., Verdaguer, N., Mateu, M.G. y Domingo, E. (1997). Evolution subverting essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6798-6802.

Martínez-Bilbao, M. y Huber, R.E. (1994). Substitutions for Gly-794 show that binding interactions are important determinants of the catalytic action of beta-galactosidase (*Escherichia coli*). *Biochem. Cell. Biol.*, **72**, 313-319.

Martínez-Salas, E., Ortin, J. y Domingo, E. (1985). Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, **35**, 55-61.

Marvin, J.S., Corcoran, E.E., Hattangadi, N.A., Zhang, J.V., Gere, S.A. y Hellinga, H.W. (1997). The rational design of allosteric interactions in a monomeric protein and its applications to the construction of biosensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4366-4371.

Mason, P.W., Rieder, E. y Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cell 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., Rocha, E., Vicente, O., Vayreda, F., Navalpotro, C., Andreu, D., Pedroso, E., Giralt, E., Enjuanes, L. y Domingo, E. (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.*, **8**, 261-274.

Mateu, M.G., Da Silva, J.L., Rocha, E., De Brum, D.L., Alonso, A., Enjuanes, L., Domingo, E. y Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, **167**, 113-124.

Mateu, M.G., Martínez, M.A., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F. y Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5883-5887.

Mateu, M.G., Martínez, M.A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. y Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.*, **71**, 629-637.

Mateu, M.G., Hernandez, J., Martínez, M.A., Feigelstock, D., Lea, S., Perez, J.J., Giralt, E., Stuart, D., Palma, E.L., Domingo, E. (1994). Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J. Virol.*, **68**, 1407-1417.

Mateu, M.G., Camarero, J.A., Giralt, E., Andreu, D. y Domingo, E. (1995). Direct evaluation of the immunodominance of a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus in a natural host. *Virology*, **206**, 298-306.

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.

McKenna, T.S., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. y Mason, P.W. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *J. Virol.*, **69**, 5787-5790.

McKnight, J.L. y Fried, V.A. (1983). A novel proteolytic activity apparently initiating degradation of beta-galactosidase nonsense fragments in *in vitro* extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **258**, 7550-7555.

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCafferty, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. y Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, **388**, 882-887.

Mooser, G. (1992). The enzymes. Sigman, D.S., Ed. vol. XX, cap. 5, pp: 201-208, Academic Press, NY.

Morgan, C.L., Newman, D.J. y Price, C.P. (1996). Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clin. Chem.*, **42**, 193-209.

Morris, K.N., Jensen, K.B., Julin, C.M., Weil, M. y Gold, L. (1998). High affinity ligands from *in vitro* selection: complex targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2902-2907.

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 the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J. Virol.*, **72**, 3587-3594.

Newman, J.F., Cartwright, B., Doel, T.R. y Brown, F. (1979). Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, **45**, 497-507.

Newman, J.F., Piatti, P.G., Gorman, B.M., Burrage, T.G., Ryan, M.D., Flint, M. y Brown, F. (1994). Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 733-737.

Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. y Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single-pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.*, **13**, 692-698.

Nolan, G.P. (1997). Harnessing viral devices as pharmaceuticals: fighting HIV-1's fire with fire. *Cell*, **90**, 821-824.

Novella, I.S., Borrego, B., Mateu, M.G., Domingo, E., Giralt, E. y Andreu, D. (1993). Use of substituted and tandem-repeated peptides to probe the relevance of the highly conserved RGD tripeptide in the immune response against foot-and-mouth disease virus. *FEBS Lett.*, **330**, 253-259.

O'Sullivan, C.K. (2002). Aptasensors: the future of biosensing?. *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 44-48.

Palmenberg, A.C. (1990). Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**, 603-623.

Pancrazio, J.J., Whelan, J.P., Borkholder, D.A., Ma, W. y Stenger, D.A. (1999). Development and application of cell-based biosensors. *Ann. Biomed. Eng.*, **27**, 697-711.

Pantoliano, M.W., Bird, R.E., Johnson, S., Asel, E.D., Dodd, S.W.,

- Wood, J.F. y Hardman, K.D. (1991). Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **30**, 10117-10125.
- Pedersen, H., Hölder, S., Sutherlin, D.P., Schwitter, U., King, D.S. y Schultz, P.G. (1998). A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10523-10528.
- Pereira, H.G. (1977). Developments in biological standardization. Mackoviak, C. y Regamey, R.H., Eds. S.Karger, Basel. 167-174.
- Phadke, R.S. (1992). Biosensors and enzyme immobilized electrodes. *Biosystems*, **27**, 203-206.
- Pierschbacher, M.D. y Ruoslahti, E. (1987). Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17294-17298.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P. and Neri, D. (1998). Design and use of a phage display library: human antibodies with sub-nanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21769-21776.
- Poignard, P., Fouts, T., Naniche, D., Moore, J.P. y Sattentau, Q.J. (1996). Neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type-1 gp120 induce envelope glycoprotein subunit dissociation. *J. Exp. Med.*, **183**, 473-484.
- Polatnick, J. y Arlinghaus, R.B. (1967). Foot-and-mouth disease virus-induced ribonucleic acid polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, **31**, 601-608.
- Pollack, S.J., Nakayama, G.R. y Schultz, P.G. (1988). Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites. *Science*, **242**, 1038-1040.
- Porter, A.G. (1993). Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.*, **67**, 6917-6921.
- Post, P.L., Trybus, K.M. y Taylor, D.L. (1994). A genetically engineered, protein-based optical biosensor of myosin II regulatory light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12880-12887.
- 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.
- Ramanathan, K. y Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 417-423.
- Ramírez, E., Más, J.M., Carbonell, X., Avilés, X. y Villaverde, A. (1999). Detection of molecular interactions by using a new peptide-displaying bacteriophage biosensor. *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **262**, 801-805.
- Ramsden, J.J. (1997). Optical biosensors. *J. Mol. Recognit.*, **10**, 109-120.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Webber, K.O., Jung, S.H., Lee, B. y Pastan I. (1994). Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng.*, **7**, 697-704.

Richard, J.P., Huber, R.E., Lin, S., Heo, C. y Amyes, T.L. (1996). Structure-reactivity relationships for beta-galactosidase (*Escherichia coli*, LacZ). 3. Evidence that Glu-461 participates in Bronsted acid-base catalysis of beta-D-galactopyranosyl group transfer. *Biochemistry*, **35**, 12377-12386.

Ring, M., Bader, D.E. y Huber, R.E. (1988). Site-directed mutagenesis of beta-galactosidase (*E.coli*) reveals that tyr-503 is essential for activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**, 1050-1055.

Roberts, B.L., Markland, W., Ley, A.C., Kent, R.B., White, D.W., Guterman, S.K. y Ladner, R.C. (1992). Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2429-2433.

Roitt, I. (1991). *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, London.

Romoser, V.A., Hinkle, P.M. y Persechini, A. (1997). Detection in living cells of Ca²⁺- dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13270-13274.

Rossmann, M.G., Arnold, E., Erickson, J.W., Frankenberger, E.A., Griffith, J.P., Hecht, H.J., Johnson, J.E., Kamer, G., Luo, M., Mosser, A.G., Rueckert, R.R., Sherry, B. y Vriend, G. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, **317**, 145-153.

Roth, N.J. y Huber, R.E. (1996). The beta-galactosidase (*Escherichia coli*) reaction is partly facilitated by

interactions of His-540 with the C6 hydroxyl of galactose. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14296-14301.

Rotman, M.B. y Celada, F. (1968). Antibody-mediated activation of a defective beta-D-galactosidase extracted from an *Escherichia coli* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 660-667.

Rowlands, D., Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R. y Newman, J. (1994). The structure of an immunodominant loop on foot-and-mouth disease virus, serotype O1, determined under reducing conditions. *Arch. Virol. Suppl.*, **9**, 51-58.

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

Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A. y Mason, P.W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J. Virol.*, **71**, 5115-5123.

Sangar, D.V., Newton, S.E., Rowlands, D.J. y Clarke, B.E. (1987). All foot-and- mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3305-3315.

Scheller, F.W., Renneberg, R. y Schubert, F. (1988). Coupled enzyme reactions in enzyme electrodes using sequence, amplification, competition, and antiinterference principles. *Methods Enzymol.*, **137**, 29-43.

Silhavy, T.J. y Beckwith, J.R. (1985). Uses of lac fusions for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.*, **49**, 398-418.

- Skerra, A. y Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, **240**, 1038-1041.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-1317.
- Smith, J.W., Vestal, D.J., Irwin, S.V., Burke, T.A. y Cheresch, D.A. (1990). Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11008-11013.
- Sobrinho, F., Davila, M., Ortin, J. y Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, **128**, 310-318.
- Stefan, R.I., van Staden, J.F. y Aboul-Enein, H.Y. (2000). Immunosensors in clinical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, **366**, 659-668.
- Strebel, K. y Beck, E. (1986). A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, **58**, 893-899.
- Strohmaier, K., Franze, R. y Adam, K.H. (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J. Gen. Virol.*, **59**, 295-306.
- Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Núñez, J.I., Rodríguez, A., Saiz, J.C., Blanco, E., Valero, M.L., Roig, X., Camarero, J.A., Andreu, D., Mateu, M.G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrinho, F. y Palma, E.L. (1997). A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J. Virol.*, **71**, 2606-2614.
- Takkinen, K., Laukkanen, M.L., Sizmann, D., Alfthan, K., Immonen, T., Vanne, L., Kaartinen M., Knowles, J.K. y Teeri, T.T. (1991). An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Eng.*, **4**, 837-841.
- Tavladoraki, P., Girotti, A., Donini, M., Arias, F.J., Mancini, C., Morea, V., Chiaraluce, R., Consalvi, V. y Benvenuto, E. (1999). A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *Escherichia coli* and transgenic plants. *Eur. J. Biochem.*, **262**, 617-624.
- Tesar, M. y Marquardt, O. (1990). Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology*. **174**, 364-374.
- Ullmann, A. (1984). One-step purification of hybrid proteins which have beta-galactosidase activity. *Gene*, **29**, 27-31.
- Ullmann, A. (1992). Complementation in beta-galactosidase: from protein structure to genetic engineering. *Bioessays*, **14**, 201-205.
- Van der Schoot, B.H. y Bergveld, P. (1987). ISFET based enzyme sensors. *Biosensors*, **3**, 161-186.
- Van Regenmortel, M.H. y Choulier, L. (2001). Recognition of peptides by antibodies and investigations of affinity using biosensor technology. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **4**, 385-395.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. and Johnson, K.S. (1996). Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 309-314.

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., Fita, I., Domingo, E. y Mateu, M.G. (1997). Efficient neutralization of foot-and-mouth disease virus by monovalent antibody binding. *J. Virol.*, **71**, 9813-9816.

Viaplana, E., Feliu, J.X., Corchero, J.L. y Villaverde, A. (1997). Reversible activation of a cryptic cleavage site within *E. coli* beta-galactosidase in beta-galactosidase fusion proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1343**, 221-226.

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., Arís, 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.

Wallenfels, K. y Weil, R. (1972). The Enzymes. Boyer, P.D., Ed. vol. VII, cap. 20, pp. 617-663, Academic Press, NY.

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.

Widersten, M. y Mannervik, B. (1995). Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J. Mol. Biol.*, **250**, 115-122.

Wijesuriya, D.C. y Rechnitz, G.A. (1993). Biosensors based on plant and animal tissues. *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 155-160.

Wilkinson, A.J., Fersht, A.R., Blow, D.M., Carter, P. y Winter, G. (1984). A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature*, **307**, 187-188.

Wimmer, E. (1979). The genome-linked protein of picornaviruses: discovery, properties and possible functions. The molecular biology of picornaviruses. pp. 175-190. Ed.: Perez-Bercoff, R. Plenum Press, New York.

Winter, G., Fersht, A.R., Wilkinson, A.J., Zoller, M. y Smith, M. (1982). Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding. *Nature*, **299**, 756-758.

Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433-455.

Wolfbeis, O.S. (2002). Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.*, **74**, 2663-2677.

Yang, S., Veide, A. y Enfors, S.O. (1995). Proteolysis of fusion proteins: stabilization and destabilization of staphylococcal protein A and *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**, 145-159.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Dado que aún se desconocen las bases exactas de la modulación de la actividad β -galactosidasa, la finalidad principal de este trabajo ha sido determinar el tipo de interacciones moleculares que son necesarias para que se lleve a cabo dicha reactivación. Especialmente, se pretendía evaluar la necesidad de una unión bivalente para la reactivación y explorar la adaptación de los biosensores β -galactosidasa a la detección de ligandos monovalentes, como antígenos. Por lo tanto, los objetivos concretos que se plantearon fueron los siguientes:

1. Estudiar la respuesta de los sensores M278VP1 y JX795A a ligandos de RGD distintos a anticuerpos, como es el caso de las integrinas receptoras del VFA.
2. Explorar la respuesta enzimática de M278VP1 frente a un anticuerpo recombinante scFv dirigido contra el sitio A del VFA.
3. Construir y producir en *Escherichia coli* β -galactosidasas híbridas exponiendo en su superficie un scFv recombinante del anticuerpo monoclonal SD6.
4. Evaluar la inmunoreactividad de dichas proteínas y su capacidad de respuesta enzimática frente al antígeno correspondiente.
5. Determinar el potencial global de los biosensores basados en β -galactosidasas híbridas para detectar ligandos distintos a los anticuerpos.

4. ARTÍCULOS

El siguiente es el listado de artículos en los cuales se basa la presente tesis, aparecen por orden de fecha de publicación:

Artículo I

“Efficient accommodation of recombinant, foot-and-mouth disease virus RGD peptides to cell-surface integrins”

P. Alcalá, J.X. Feliu, A. Arís y A. Villaverde

Biochemical and Biophysical Research Communications **285**, 201-206 (2001)

Artículo II

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

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

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

Artículo III

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

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

FEBS Letters en prensa

4.1 Artículo I

Efficient Accommodation of Recombinant, Foot-and-Mouth
Disease Virus RGD Peptides to Cell-Surface Integrins

P. Alcalá, J.X. Feliu, A. Arís and A. Villaverde

Biochemical and Biophysical Research Communications **285**, 201-206 (2001)

RESUMEN

En este trabajo hemos evaluado la interacción molecular entre un péptido RGD recombinante del virus de la fiebre aftosa, expuesto en la superficie de una proteína portadora y sus receptores en la superficie celular. Como ligandos se utilizaron las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ solubles, así como células BHK₂₁ que son sensibles a la infección por el virus. Los resultados indicaron que ni las integrinas solubles ni aquellas expuestas en las células son capaces de modificar la actividad de sensores enzimáticos que por el contrario son activados por la unión de anticuerpos dirigidos contra el motivo RGD. Adicionalmente, se realizaron otros ensayos para determinar el impacto que podía tener la presentación múltiple de péptidos sobre la eficiencia de la unión a células. En este caso se observó que aumentando el número de segmentos virales mejoraba la unión de las proteínas recombinantes a las células. Los resultados obtenidos se discuten en el contexto de una acomodación molecular del péptido viral recombinante a las integrinas.