



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Anticuerpos recombinantes como herramientas en neurobiología: producción y caracterización de anticuerpos monoclonales recombinantes para detectar proteínas sinápticas

Adrián Torres Villasante

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Curso académico 2019/2020

Tutora Académica:
Esther Giraldo Reboloso

Cotutor:
Pietro Fazzari

Cotutora:
Carmen Navarro González

Valencia, julio de 2020



Título del TFG: Anticuerpos recombinantes como herramientas en neurobiología: producción y caracterización de anticuerpos monoclonales recombinantes para detectar proteínas sinápticas.

Titulación: Grado en Biotecnología

Lugar de realización: Centro de Investigación Príncipe Felipe

Alumno: D. Adrián Torres Villasante

Tutora Académica: Prof. Dra. Esther Giraldo Reboloso

Cotutor: Dr. Pietro Fazzari

Cotutora colaboradora: Dra. Carmen Navarro González

Valencia, julio de 2020

Palabras clave: Neurobiología, anticuerpo, DNA recombinante, neurona, inmunocitoquímica, sinapsis, anticuerpos recombinantes.

Resumen: Uno de los retos más relevantes en el ámbito de la neurobiología es entender y caracterizar completamente los mecanismos responsables de la formación, mantenimiento y modificación de la sinapsis. La aplicación de procedimientos inmunológicos a estudios sobre las sinapsis requiere el uso de anticuerpos lo más puros y específicos posibles. Utilizando anticuerpos monoclonales derivados de la tecnología del DNA recombinante; se aseguraría la producción de un único anticuerpo molecularmente definido y representaría una herramienta sumamente útil en este campo.

A diferencia de los anticuerpos policlonales que requieren la inmunización de animales y de los anticuerpos monoclonales que se producen utilizando tecnologías tradicionales basadas en hibridoma, estos anticuerpos son generados in vitro utilizando DNA plasmídico. Esto hace que esta tecnología sea interesante desde tres puntos de vista: se cumple el reemplazo, uno de los ejes básicos del concepto de protección animal en investigación; se reducen costes y tiempo de producción, ya que no es necesario producir ni mantener hibridomas; y se aumenta la reproducibilidad. Además, un anticuerpo recombinante puede convertirse fácilmente en una especie, isotipo o subtipo diferente. Este aspecto es muy relevante, ya que los procesos de humanización de anticuerpos se basan en la tecnología del DNA recombinante.

El presente trabajo plantea la optimización de un protocolo de producción y la caracterización de cinco anticuerpos monoclonales recombinantes capaces de reconocer proteínas que funcionan como marcadores neuronales y de las conexiones sinápticas. Así pues, se describe un protocolo para la producción de dichos anticuerpos, y su validación para su correcto funcionamiento en neurobiología.

Títol: Anticossos recombinants com a eines en neurobiologia: producció i caracterització d'anticossos monoclonals recombinants per a detectar proteïnes sinàptiques.

Paraules clau: Neurobiologia, anticòs, DNA recombinant, neurona, immunocitoquímica, sinapsi, anticossos recombinants.

Resum: Un dels reptes més rellevants en l'àmbit de la neurobiologia és entendre i caracteritzar completament els mecanismes responsables de la formació, manteniment i modificació de la sinapsi. L'aplicació de procediments immunològics a estudis sobre les sinapsis requereix l'ús d'anticossos el més purs i específics possibles. Utilitzant anticossos monoclonals derivats de la tecnologia del DNA recombinant; s'asseguraria la producció d'un únic anticòs molecularment definit i representaria una eina summament útil en aquest camp.

A diferència dels anticossos policlonals que requereixen la immunització d'animals i dels anticossos monoclonals que es produeixen utilitzant tecnologies tradicionals basades en hibridoma, aquests anticossos són generats in vitro utilitzant DNA plasmídic. Això fa que aquesta tecnologia siga interessant des de tres punts de vista: es compleix el reemplaçament, un dels eixos bàsics del concepte de protecció animal en investigació; es redueixen costos i temps de producció, ja que no és necessari produir ni mantindre hibridomes; i s'augmenta la reproductibilitat. A més, un anticòs recombinant pot convertir-se fàcilment en una espècie, isotip o subtipus diferent. Aquest aspecte és molt rellevant, ja que els processos d'humanització d'anticossos es basen en la tecnologia del DNA recombinant.

El present treball planteja l'optimització d'un protocol de producció i la caracterització de cinc anticossos monoclonals recombinants capaços de reconèixer proteïnes que funcionen com a marcadors neuronals i de les connexions sinàptiques. Així doncs, es descriu un protocol per a la producció d'aquests anticossos, i la seua validació per al seu correcte funcionament en neurobiologia.

Title: Recombinant antibodies as tools in neurobiology: production and characterization of recombinant monoclonal antibodies to detect synaptic proteins.

Keywords: Neurobiology, antibody, recombinant DNA, neuron, immunohistochemistry, synapses, recombinant antibodies.

Abstract: One of the most relevant challenges in the field of neurobiology is to fully understand and characterize the mechanisms responsible for the formation, maintenance, and modification of synapses. The application of immune procedures to studies on synapses requires the use of antibodies as pure and specific as possible. Using monoclonal antibodies derived from recombinant DNA technology; would ensure the production of a single molecularly defined antibody and would represent a very useful tool in this field.

Unlike polyclonal antibodies that require immunization of animals and monoclonal antibodies produced using traditional hybrid-based technologies, these antibodies are generated in vitro using plasmid DNA. This makes this technology interesting from three points of view: replacement is achieved, one of the basic axes of the concept of animal protection in research; costs and production time are reduced, as there is no need to produce or maintain hybridomas; and reproducibility is increased. In addition, a recombinant antibody can easily become a different species, isotype, or subtype. This aspect is very relevant, as antibody humanization processes are based on recombinant DNA technology.

The present project proposes the optimization of a production protocol and the characterization of five recombinant monoclonal antibodies capable of recognizing proteins that function as neural and synaptic connections markers. Thus, a protocol for the production of such antibodies is described, as well as their validation for their proper functioning in neurobiology.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todos los que me han ayudado a hacer este trabajo:

A Pietro Fazzari, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el laboratorio de fisiopatología de los circuitos corticales del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

A Carmen Navarro, por su dedicación, ayuda y supervisión durante la realización de los experimentos y la lectura crítica del manuscrito de este trabajo.

A todos los que habéis llenado estos cuatro años de risas hasta en los momentos menos divertidos.

A mi familia, por apoyarme siempre.

El proyecto fue apoyado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España, subvenciones RYC- 2014-16410 y SAF2017-89020-R. La Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana financia el salario de Carmen Navarro y parte de las instalaciones utilizadas a través del Centro de Investigación Príncipe Felipe, y la UE financia algunas de las instalaciones utilizadas en este trabajo a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Rol de los anticuerpos en el sistema inmune	1
1.2. Estructura de los anticuerpos	2
1.3. Tipos de anticuerpos: monoclonales y policlonales.....	5
1.4. Anticuerpos monoclonales	6
1.5. Generación de anticuerpos recombinantes.....	8
1.6. Ventajas de los anticuerpos recombinantes.....	9
1.7. Anticuerpos en neurobiología.....	10
2. Objetivos	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Extracción del DNA plasmídico	13
3.1.1. Extracción del DNA plasmídico a pequeña escala.....	13
3.1.2. Extracción del DNA plasmídico a mediana escala.....	14
3.2. Digestión enzimática y electroforesis en gel de agarosa.....	15
3.3. Cultivos celulares	15
3.3.1. Líneas celulares COS-7 y HEK 293T	15
3.3.2. Cultivo neuronal primario	16
3.4. Transfección	16
3.5. Western blot.....	18
3.6. Inmunocitoquímica	19
3.7. Procesamiento de imágenes	20
4. Resultados	21
4.1. Validación del DNA plasmídico.....	21
4.2. Verificación de la expresión de los anticuerpos en líneas celulares	23
4.3. Test de funcionalidad en línea celular	25
4.4. Producción de los anticuerpos recombinantes a mediana escala.....	28
4.5. Test de funcionalidad en cultivo neuronal primario	28
5. Discusión	32
6. Conclusiones	34
7. Bibliografía	35
8. Anexo	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un anticuerpo.

Figura 2. Subclases o alotipos de las IgGs humanas.

Figura 3. Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales.

Figura 4. Distribución de los dominios de un anticuerpo y generación de un scFv.

Figura 5. Esquema del procedimiento experimental.

Figura 6. Esquema de los elementos del plásmido de expresión de los R-mAbs.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa.

Figura 8. Control de la transfección mediante análisis de fluorescencia.

Figura 9. Análisis mediante Western blot de la expresión de los anticuerpos recombinantes en las líneas celulares HEK 293T y COS-7.

Figura 10. Validación del anticuerpo anti-GFP en la línea celular COS-7.

Figura 11. Validación del anticuerpo anti-PSD-95 en la línea celular COS-7.

Figura 12. Validación del anticuerpo anti-VGluT1 en la línea celular COS-7.

Figura 13. Validación del anticuerpo anti-GFP en cultivo neuronal primario.

Figura 14. Optimización de la dilución del anticuerpo anti-GFP en cultivo neuronal primario.

Figura 15. Validación del anticuerpo anti-GluR1 en cultivo neuronal primario.

Figura 16. Validación del anticuerpo anti-Ank-G en cultivo neuronal primario.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los plásmidos codificantes para los anticuerpos recombinantes.

Tabla 2. Concentración del DNA plasmídico purificado.

Tabla 3. Enzima(s) de restricción utilizado(s) para cada plásmido.

Tabla 4. Volumen necesario de DNA plasmídico para la transfección.

Tabla 5. Cantidades de los reactivos usados en el protocolo de transfección.

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos inmunocitoquímicos.

Tabla 7. Tamaño teórico de los fragmentos resultantes de la digestión enzimática.

ABREVIATURAS

Ank-G: Ankirina-G

bp: pares de bases

BSA: Albúmina de suero bovino

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CDR: Regiones determinantes de complementariedad

CH: Dominio constante de la cadena pesada de moléculas de inmunoglobulina

CL: Dominio constante de la cadena ligera de moléculas de inmunoglobulina

CNV: Variación del número de copias

D: Día post-cultivo

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E: Día del desarrollo embrionario

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Fab: Fragmento de unión al antígeno de moléculas de inmunoglobulina

FBS: Suero bovino fetal

Fc: Fragmento cristizable de moléculas de inmunoglobulina

FcγR: Receptor Fc gamma

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

F-PCR: PCR de fusión

FV: Fragmento variable de moléculas de inmunoglobulina

Fw: Región de marco

GFP: Proteína verde fluorescente

GluR1: Receptor de glutamato 1

HAT: Hipoxantina-aminopterina-timidina

HRP: Peroxidasa de rábano picante

Ig: Inmunoglobulina

LB: Caldo de lisogenia

mAb: Anticuerpo monoclonal

mRNA: RNA mensajero

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: Marco abierto de lectura

pAb: Anticuerpo policlonal

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEI: Polietilenamina

PSD-95: Proteína de densidad postsináptica 95

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

R-mAb: Anticuerpo monoclonal recombinante

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa

scFv: Fragmento variable monocatenario

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

VGluT1: Transportador vesicular de glutamato 1

VH: Dominio variable de la cadena pesada de moléculas de inmunoglobulina

VL: Dominio variable de la cadena ligera de moléculas de inmunoglobulina

WB: Western blot

1. INTRODUCCIÓN

En esta introducción, se abordará el concepto de anticuerpo desde su descubrimiento hasta los avances más recientes, pasando por sus aplicaciones en el ámbito médico y en la investigación científica. Estas macromoléculas, gracias a su especificidad y afinidad a sus antígenos, así como a la posibilidad de ser manipulados fuera de los sistemas vivos; son una de las herramientas más utilizadas en Biotecnología y Biología Molecular, además de constituir el elemento clave para el diagnóstico y tratamiento de una gran variedad de enfermedades.

1. 1. ROL DE LOS ANTICUERPOS EN EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune de los animales vertebrados combate los elementos extraños (antígenos) que pueden causar enfermedades, tales como bacterias y virus, usando anticuerpos (o inmunoglobulinas, abreviado Ig). Los anticuerpos son proteínas que se unen a los antígenos de manera tan estrecha y específica que pueden identificar un solo antígeno objetivo en una mezcla compleja de diferentes moléculas (WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017; ANDREWS *et al.*, 2019). Estas proteínas son sintetizadas por los linfocitos B y por células plasmáticas derivadas de ellos, y están presentes en la sangre (en el plasma sanguíneo) y en otros fluidos biológicos (en lágrimas, secreción mucosa intestinal, saliva, líquido sinovial, líquido intersticial, etc.) (ANDREWS *et al.*, 2019). En el plasma se encuentran dentro de la fracción de las gamma globulinas y forman parte de la respuesta inmunológica adaptativa, en lo que se conoce como respuesta humoral específica (CHEN *et al.*, 2018). Los anticuerpos tienen una vida media en el organismo humano relativamente larga, de varias semanas, constituyendo una defensa muy eficaz contra agentes patógenos. Además, son muy versátiles y presentan diversas funciones biológicas. Por un lado, participan en la neutralización de toxinas, bacterias y virus. Por otro lado, llevan a cabo la opsonización, es decir, facilitan la fagocitosis por parte de los neutrófilos de bacterias que poseen cápsula o envoltura (WOOTLA *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2018). Asimismo, intervienen en la activación del sistema del complemento, uno de los componentes fundamentales de la respuesta inmunitaria. El sistema del complemento está formado por aproximadamente veinte glucoproteínas que se encuentran en el suero y otros líquidos orgánicos de forma inactiva, y que, al activarse de forma secuencial, desencadenan una serie de cascadas bioquímicas que potencian la respuesta inflamatoria, facilitan la fagocitosis y provocan la lisis de las células diana (WOOTLA *et al.*, 2014). Finalmente, los receptores Fc gamma (FcγR) también juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria. Un FcγR es una proteína que se encuentra en la superficie de ciertas células, incluidos, entre otros, linfocitos B, células dendríticas foliculares, células NK (*Natural Killer*), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas y mastocitos. Aunque se sabe que anticuerpos y FcγRs interactúan y trabajan juntos para regular estrechamente las funciones de las células efectoras, todavía se está investigando cómo funciona en detalle este sistema (VIDARSSON *et al.*, 2014; BOURNAZOS *et al.*, 2017; EGLI *et al.*, 2019).

El descubrimiento y la caracterización de los anticuerpos tienen una larga historia, que es la de la propia inmunología, y se remonta hasta finales del siglo XIX. En esa época, los microbiólogos estudiaban sobre todo los mecanismos de defensa del organismo contra los agentes microbianos, y en particular contra las toxinas bacterianas. En 1890, Emil von Behring y Shibasaburō Kitasato descubrieron la antitoxina del tétanos; y demostraron que el suero de conejos inmunizados con toxina tetánica podía tener un efecto profiláctico. Averiguaron que, cuando un animal recibía inyecciones de suero sanguíneo de otro animal infectado con la enfermedad, lo protegía del tétanos, sentando así las bases de la inmunidad humoral (WOOTLA *et al.*, 2014; KAUFMANN, 2017).

Animado por este hallazgo, von Behring aplicó con éxito esta estrategia para tratar la difteria en niños. Por este descubrimiento, que condujo a una reducción enorme de la difteria, en 1901 von Behring recibió el primer Premio Nobel de Fisiología o Medicina. Su trabajo abrió nuevas fronteras en la investigación médica, usando la terapia con suero mediante para tratar una amplia gama de enfermedades infecciosas, además de alergias y diversos tipos de cáncer. Más adelante, se descubrió que el suero obtenido de personas recuperadas de enfermedades infecciosas era más efectivo que el suero animal (WOOTLA *et al.*, 2014). En 1918, Nicolle y Conseil, dos médicos franceses, comunicaron el éxito obtenido en la profilaxis del sarampión utilizando el suero de convalecientes de dicha enfermedad (NICOLLE Y CONSEIL, 1918).

En 1920, Degkwitz informó del éxito de la inmunización pasiva contra el sarampión en más de 700 pacientes, lo que despertó un mayor interés en el suero humano. Casi dos décadas después, en 1938, Tiselius y Kabat descubrieron que los anticuerpos son globulinas que se encuentran en la fracción gamma del suero (las gammaglobulinas son mayoritariamente Igs), lo que estimuló el desarrollo de los métodos de fraccionamiento del suero (TISELIUS Y KABAT, 1938). Es en 1944 cuando Cohn consigue aislar fracciones de suero ricas en gammaglobulinas utilizando etanol frío, y dichas fracciones se utilizaron en la Segunda Guerra Mundial con el propósito de prevenir el sarampión y la hepatitis. En síntesis, el descubrimiento de Tiselius y Kabat provocó el desarrollo de los medios necesarios para usar anticuerpos policlonales en el entorno clínico (WOOTLA *et al.*, 2014). Inicialmente, las preparaciones de inmunoglobulinas se administraban por vía intramuscular, pero el volumen de inyección quedaba muy limitado; por lo que se comenzaron a preparar inmunoglobulinas para infusión endovenosa (IgEV). Estas nuevas preparaciones presentaban efectos indeseables relacionados con las técnicas de fraccionamiento, porque se formaban complejos o agregados de IgGs que desencadenaban respuestas anafilactoides en el paciente tras la IgEV. A partir de 1980, los avances en los métodos de fraccionamiento, purificación y ultrafiltración permitieron evitar los agregados de IgGs, resolviendo así este problema (SORENSEN *et al.*, 1984).

1. 2. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos son glucoproteínas del tipo gamma globulina en forma de Y (Figura 1). La estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, pero una pequeña región de la proteína es enormemente variable, y esta es la razón de la existencia de millones de anticuerpos, cada uno sutilmente distinto. A esta parte de la proteína se la conoce como región hipervariable. Cada una de estas variantes se puede unir a un antígeno distinto y esto permite al sistema inmune combatir una variedad prácticamente infinita de agentes patógenos (WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017). La parte del antígeno reconocida por el anticuerpo se denomina epítipo, mientras que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que se unen a un determinado epítipo conforma lo que se denomina paratopo, y consta de 5 a 10 aminoácidos (ANDREWS *et al.*, 2019). Los anticuerpos, por lo general, consisten en cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras (de aproximadamente 25 kDa cada una) y dos cadenas pesadas más largas (de aproximadamente 50 kDa cada una) unidas por uno o varios puentes disulfuro (Figura 1). Cada cadena ligera se pliega para formar dos dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL). Cada cadena pesada se pliega para formar cuatro o más dominios, uno variable (VH) y tres o más dominios constantes (CH1, CH2 y CH3 en la Figura 1). Los dominios VL y CL de una cadena ligera se asocian con los dominios VH y CH1 de una cadena pesada para formar un fragmento de unión al antígeno (Fab). Dos Fabs forman los brazos de la estructura en forma de Y del anticuerpo. Los dominios constantes restantes de cada cadena pesada (CH2 y CH3) se unen para formar el asta de la Y, constituyendo

el fragmento cristizable o constante (Fc) (DUNBAR *et al.*, 2013; MA Y O'KENNEDY, 2015). Las cadenas pesadas presentan regiones bisagra entre CH1 y CH2 (Figura 1) que dotan de flexibilidad a los anticuerpos para interactuar con la molécula antigénica (WOOF Y BURTON, 2004).

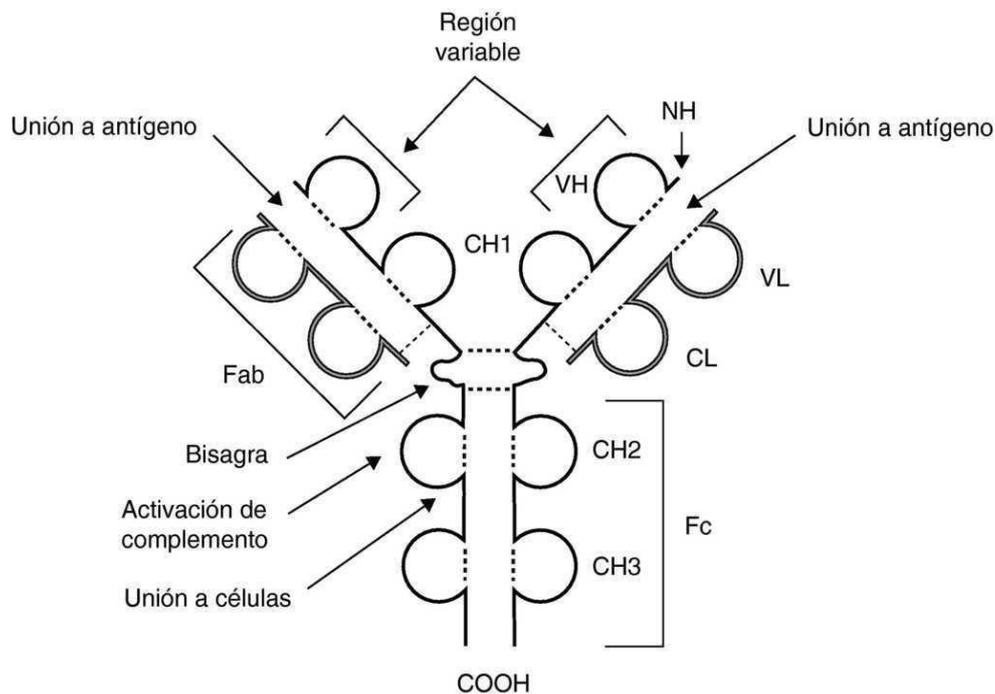


Figura 1. Estructura de un anticuerpo. Se pueden observar las cadenas ligeras (L) y pesadas (H) con sus regiones variables (VL, VH) y constantes (CL, CH1, CH2, CH3); así como las regiones bisagra de las cadenas pesadas. Los puentes disulfuro intra e intercatenarios se encuentran representados con líneas discontinuas. La unión al antígeno se da en los dominios VH/VL, mientras que las funciones efectoras están mediadas por el fragmento Fc (fragmento constante o cristizable), el cual forma parte de la cadena pesada (CH). Fab: fragmento de unión al antígeno (GARCÍA, 2011).

La mayor parte de la cadena pesada y aproximadamente la mitad de la cadena ligera están constituidas por dominios constantes, y estos son los que definen el isotipo particular de un anticuerpo, mientras que las cadenas ligeras existen en dos formas o isotipos, kappa (κ) y lambda (λ) (TOWNSEND *et al.*, 2016). Así pues, las moléculas de anticuerpo se codifican mediante tres genes: gen de la cadena pesada, gen κ de la cadena ligera y gen λ de la cadena ligera (DUNBAR *et al.*, 2013). Un anticuerpo típicamente tiene dos sitios de unión a antígeno idénticos, uno en el extremo de cada región Fab (Figura 1). En ambos dominios VH y VL de la región Fab (se denomina colectivamente fragmento variable (FV)) hay tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que dotan de especificidad de unión al antígeno al anticuerpo.: H1, H2 y H3 en VH y L1, L2 y L3 en VL (NORTH *et al.*, 2011). Los residuos en cada dominio variable fuera de las CDR se denominan regiones marco o de entramado (Fw, del inglés *framework region*, también puede abreviarse como FR). Estas regiones presentan una secuencia relativamente conservada y tienen una estructura β -sándwich (DUNBAR *et al.*, 2013). Debido a que la secuencia de aminoácidos de cada CDR es única, puede considerarse la "fingerprint" del anticuerpo, y también se les denomina frecuentemente 'dominios hipervariables' (ABBAS *et al.*, 2014). Al comprender la naturaleza y diversidad de los paratopos específicos para antígenos asociados a enfermedades, se pueden desarrollar anticuerpos terapéuticos diseñados racionalmente (DUNBAR *et al.*, 2013).

La estructura de un anticuerpo refleja la estructura genómica del linfocito que lo produce. Por lo tanto, en el genoma de los linfocitos hay partes constantes y una parte hipervariable que se recombina, gracias a esto un anticuerpo es capaz de producir anticuerpos contra antígenos que no existen hoy, es decir contra enfermedades nuevas (GUILBERT *et al.*, 2020). De hecho, los loci que codifican Igs se encuentran entre las regiones más dinámicas del genoma humano, exhibiendo una alta variación alélica y de número de copias (CNV, *copy number variation*). Es importante señalar que la variación de la línea germinal contribuye a las diferencias en la función de los anticuerpos (LIU Y LUCAS, 2003; WATSON Y BREDEEN, 2012) y también se refleja en la variación interindividual de los repertorios primarios de anticuerpos expresados (BOYD *et al.*, 2010), los cuales son heredables (GLANVILLE *et al.*, 2011).

La gran diversidad de anticuerpos existente se genera a través de procesos de recombinación somática e hipermutagénesis en un set de genes variables. Los genes de las cadenas ligeras se agrupan en 2 segmentos génicos de la región variable: V (variable) y J (unión) y un segmento constante (C) distinto según se trate de cadenas κ o λ . Por su parte, las cadenas pesadas tienen 3 segmentos en las regiones variables: V, D (diversidad) y J, y un segmento C distinto según el isotipo de cada Ig. En los seres humanos, la cadena ligera κ depende de una región en el cromosoma 2 que agrupa los segmentos V, J y C. Los mismos segmentos génicos responsables de la cadena λ están en el cromosoma 22. Los segmentos V, D, J y C de las cadenas pesadas se sitúan en un área del cromosoma 14 (GARCÍA, 2011). Gracias a esta enorme diversidad, un ser humano puede producir más de 10^9 moléculas de anticuerpos diferentes incluso en ausencia de estimulación antigénica; es lo que se llama repertorio primario o preinmune de anticuerpos (ALBERTS *et al.*, 2002). En vertebrados, el proceso que genera un repertorio diverso de inmunoglobulinas es la recombinación V(D)J, un mecanismo de recombinación genética que se da en los locus que codifican para las cadenas pesadas de los anticuerpos. En los linfocitos B en desarrollo, el primer evento de recombinación tiene lugar entre un gen del segmento D y otro del segmento J del locus de la cadena pesada, eliminando el fragmento de DNA entre los segmentos seleccionados. Tras esta recombinación D-J se produce la unión con el gen V, a partir de una región *upstream* del recientemente formado complejo DJ, para dar lugar a un gen VDJ reorganizado (BOYD *et al.*, 2010; VIDARSSON *et al.*, 2014) (Figura suplementaria 1 del anexo).

En cuanto a los isotipos de anticuerpos; en ratones, los isotipos de la cadena pesada son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las IgG son el isotipo más versátil porque las regiones constantes de sus diversos alotipos dotan a esta clase en su conjunto del espectro más amplio de actividad biológica: activan el complemento, modulan las funciones de las células efectoras y permiten que el anticuerpo experimente transición (VIDARSSON *et al.*, 2014). Las IgG de ratón se subdividen en las subclases o alotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (MANNING *et al.*, 2012). En humanos existen cuatro alotipos ligeramente diferentes para IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) (Figura 2) y se diferencian dos isoformas de IgA (IgA1 e IgA2) (VIDARSSON *et al.*, 2014). Dentro de las IgGs, IgG1 tiene la mayor afinidad de unión a Fc γ R, seguida de IgG3, IgG2 e IgG4 (YU *et al.*, 2020). Una particularidad de las IgG es que, a diferencia de los otros isotipos de anticuerpos, su estado de glucosilación tiene un impacto significativo en la forma en que media la función efectora, presumiblemente debido a su papel en la unión del anticuerpo-Fc γ R; cuando el único sitio de glucosilación en la cadena pesada de la IgG está mutado, la proteína "sin azúcar" muestra una afinidad mínima o nula por el Fc γ R. Esto está basado en diversos estudios *in vitro* que sugieren un papel *in vivo* para la glucosilación de IgG, que se ve respaldado por el hecho de que el sitio de glucosilación, una asparagina cerca de las regiones articuladas del Fc, se conserva evolutivamente (DONDELINGER *et al.*, 2018).

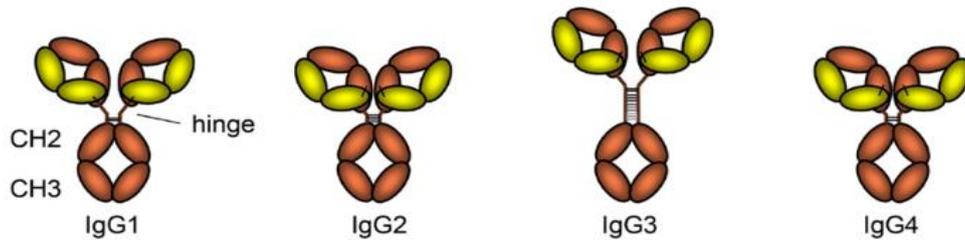


Figura 2. Subclases o alotipos de las IgGs humanas. Subclases de IgGs, longitud de la región bisagra y número de puentes disulfuro que conectan las dos cadenas pesadas. Se muestra la ubicación de las regiones bisagra, así como de CH2 y CH3. Ig: inmunoglobulina; CH: dominio constante de la cadena pesada (VIDARSSON *et al.*, 2014).

1. 3. TIPOS DE ANTICUERPOS: MONOCLONALES Y POLICLONALES

Los anticuerpos son una de las herramientas más importantes en Biología Molecular. Por un lado, en la investigación básica se usan anticuerpos para identificar, localizar, aislar y cuantificar proteínas específicas (GAO *et al.*, 2018). Por otro lado, los investigadores clínicos utilizan con frecuencia anticuerpos para dirigir un fármaco específico (como por ejemplo un agente quimioterapéutico) a una célula en particular (BREEDVELD, 2000). De este modo, debido a la especificidad celular proporcionada por el anticuerpo, se puede administrar una mayor cantidad de fármaco a la célula objetivo sin toxicidad sistémica (SANZ *et al.*, 2005; WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017). En cualquier caso, e independientemente de la especie, tipo de célula o sistema de órganos que se esté estudiando, es casi inevitable que se utilice un ensayo basado en anticuerpos en algún momento; y la utilidad de un anticuerpo está estrictamente vinculada a la disponibilidad del epítipo al que se une en la técnica biotecnológica utilizada y a la especificidad de este (BRADBURY *et al.*, 2003; KOBAYASHI Y OYAMA, 2013).

En presencia de un antígeno, centenares de linfocitos B diferentes empiezan a producir anticuerpos contra él. Un antígeno presentará diversas proteínas, y el sistema inmune puede, por así decirlo, escoger a cualquiera de ellas como objetivo para atacarla. Así pues, en el suero habrá un 'cóctel' de anticuerpos diferentes, ya que han sido generados por diferentes linfocitos, y cada uno reconocerá un epítipo diferente (NUTT *et al.*, 2015). En base a esto, podemos distinguir entre anticuerpos policlonales (pAbs), que reconocen múltiples epítipos de un mismo antígeno, y anticuerpos monoclonales (mAb), los cuales reconocen un solo epítipo porque han sido producidos por un solo clon de linfocito B (WOOTLA *et al.*, 2014). Es menos probable que estos últimos presenten reactividad cruzada porque, al reconocer un solo epítipo, lo que implica una estructura tridimensional única, tienen un nivel muy significativo de especificidad (WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017).

Los mAbs, como reconocen un solo epítipo, son más específicos que los pAbs. Sin embargo, la mono-especificidad de los mAbs también puede limitar su utilidad. Pequeños cambios en la estructura de un epítipo (por ejemplo, como consecuencia del polimorfismo genético, la glucosilación o la desnaturalización) pueden afectar notablemente la función de un mAb (WOOTLA *et al.*, 2014, SHEPARD *et al.*, 2017). Por esta razón, los mAbs deben generarse en presencia del estado del antígeno al que eventualmente tendrán que unirse. En contraste, debido a que los pAbs son heterogéneos y reconocen una gran cantidad de epítipos antigénicos, es menos probable que el efecto del cambio en un número único o pequeño de epítipos sea significativo (WOOTLA *et al.*, 2014). Los pAbs también son más estables en un rango de pH amplio y a diferentes concentraciones de sal, mientras que los mAbs pueden ser altamente susceptibles a pequeños cambios en ambos (WOOTLA *et al.*, 2014; ASCOLI Y AGGELER, 2018). Aun así, las ventajas que en

determinadas ocasiones pudiere presentar un pAb frente a un mAb dependen por completo del contexto, del uso que se le vaya a dar al anticuerpo. En cambio, las ventajas que presentan los mAbs (y que se describirán con mayor detalle más adelante) son intrínsecas a esta tecnología, independientes del uso que se les quiera dar.

Es importante tener en cuenta que predecir si en un experimento un anticuerpo funcionará adecuadamente es relativamente difícil y la mejor manera de comprobarlo es experimentalmente (WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017). No obstante, se pueden hacer conjeturas muy precisas teniendo en cuenta que la disponibilidad del epítipo tiende a correlacionarse con la estructura que se ha anticipado que la proteína presentará en el ensayo. De este modo, cuando un anticuerpo se une a una proteína que presenta una determinada conformación en un ensayo, es probable que lo reconozca en otra técnica donde el antígeno está en la misma conformación, permitiendo extender su uso a diferentes experimentos. Por ejemplo, si un anticuerpo funciona en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con una conformación nativa de la proteína, es probable que se una al objetivo en citometría de flujo, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, cristalografía de rayos X, y posiblemente incluso *in vivo*; suponiendo que no haya interacciones proteína-proteína o modificaciones post-traduccionales que bloqueen o alteren los sitios de unión de anticuerpos (WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017; GAO *et al.*, 2018). Por lo tanto, los controles experimentales son clave para garantizar que el anticuerpo solo reconozca el objetivo que se está estudiando, de manera que es vital caracterizar el anticuerpo que se vaya a utilizar antes de su uso. Para realizar controles de especificidad se pueden utilizar muestras que no contengan el antígeno de interés (por ejemplo, células y animales knockout y knockdown) (DELIC *et al.*, 2018), o fuentes naturales en las que se ha comprobado que el antígeno no se expresa (WEIS-GARCÍA Y CARNAHAN, 2017).

Como se detallará más adelante, los anticuerpos humanizados y sus derivados recombinantes, tales como fragmentos variables monocatenarios o scFv (*single-chain variable fragment*), pueden construirse en base a mAbs de ratones que han demostrado tener la actividad *in vivo* deseada en estudios preclínicos (CHEN *et al.*, 2015; TAMAKI *et al.*, 2018).

1. 4. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad para un antígeno, ya que al provenir de un solo clon de linfocito B reconocen únicamente un determinado epítipo. Para producirlos, se inyecta a un ratón un antígeno para inducir la producción de anticuerpos contra dicho antígeno. Posteriormente, se aíslan los linfocitos B del bazo del ratón y se fusionan con linfocitos B inmortales a partir de un tumor de médula ósea (mieloma humano). El producto de esta fusión es lo que se conoce como hibridoma. Los hibridomas se cultivan en medio HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina), en el que las células no fusionadas no sobreviven, debido a que la aminopterina bloquea la síntesis de nucleótidos y estas células no pueden sintetizar nucleótidos *de novo*. A continuación, los hibridomas se separan y se dividen en cultivos, para así poder seleccionar el cultivo de hibridoma que fabrica el anticuerpo de interés (GARCÍA, 2011; SHEPARD, 2017). Los hibridomas creados pueden conservarse indefinidamente en dimetil sulfóxido y los anticuerpos monoclonales se purifican a partir de los sobrenadantes (GARCÍA, 2011). Cabe mencionar que, si bien en la inmensa mayoría de los casos se inmunizan ratones para producir hibridomas, también es posible conseguir hibridomas a partir de linfocitos B de bazo de conejo fusionados con mieloma (PARK *et al.*, 2016).

Los anticuerpos monoclonales fueron producidos por primera vez en la primera mitad de los años setenta por César Milstein y Georges Köhler en el Laboratorio de Biología Molecular (LMB) de Cambridge (Reino Unido), mientras investigaban los mecanismos moleculares de la generación de diversidad de los anticuerpos. Su objetivo era producir una célula B inmortal con especificidad conocida, para así poder analizar en detalle las mutaciones de los genes de las Igs. El trabajo de estos investigadores fue publicado en la revista *Nature* en 1975 (KÖHLER Y MILSTEIN, 1975) y en 1984 recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por este descubrimiento. La trascendencia de esta técnica fue enorme, ya que por primera vez era posible disponer de cantidades ilimitadas de anticuerpos con especificidades precisas.

El primer uso de los anticuerpos monoclonales en terapia humana fue en 1982 para el tratamiento de un linfoma (MILLER *et al.*, 1982). Pronto se vio que estos productos monoclonales iniciales eran verdaderamente útiles en ensayos de laboratorio y de investigación y diagnóstico de animales, pero no eran idóneos como agentes terapéuticos debido a las reacciones inmunes del paciente contra la proteína extraña de ratón. Posteriormente, en 1984, se desarrolló la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón-humano para solventar este problema (MORRISON *et al.*, 1984); y, más adelante, se exploraron medios para humanizarlos y crear anticuerpos monoclonales recombinantes completamente humanos (MOUNTAIN Y ADAIR, 1992). Por quimerización entendemos la producción de anticuerpos monoclonales en los que solamente la región variable es de origen murino, y el resto de las cadenas pesadas y ligeras es de origen humano. En los anticuerpos humanizados, las CDR de origen no humano de interés se manipulan para que se asemejen a la región variable de una inmunoglobulina humana con el fin de minimizar el efecto antigénico, y se introducen en un anticuerpo humano que funciona de *scaffold* (WALDMANN, 2019). De este modo, sólo son murinas las regiones hipervariables de las cadenas ligeras y pesadas; y para generarlos se cambia el plásmido de expresión introduciendo una secuencia humana (Figura 3). Por otro lado, determinar la composición CDR de los anticuerpos producidos por pacientes con trastornos autoinmunes cuando no se conocen los antígenos tiene el potencial de facilitar un diagnóstico más detallado y abre las puertas a un tratamiento médico personalizado (DONDELINGER *et al.*, 2018). Las convenciones utilizadas en la nomenclatura de los anticuerpos monoclonales indican si son de ratón (-omab), quiméricos (-ximab), humanizados (-zumab) o completamente humanos (-umab).

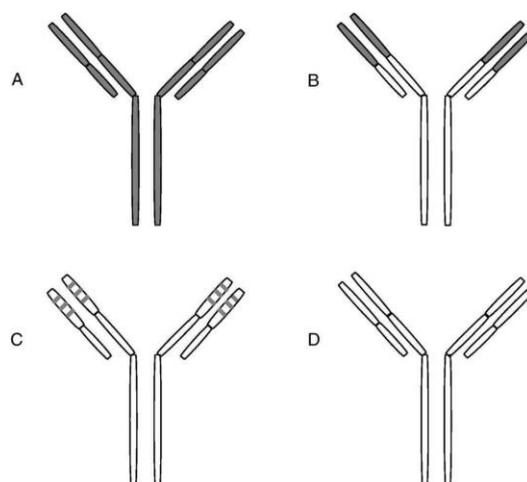


Figura 3. Quimerización y humanización de anticuerpos monoclonales. A) Monoclonal murino. B) Monoclonal quimérico, en el que las regiones variables son de origen murino siendo humano el resto de las cadenas. C) Monoclonal humanizado: sólo incluye los segmentos hipervariables de origen murino. D) Monoclonal humano (GARCÍA, 2011).

Las principales ventajas de los mAbs son su homogeneidad y consistencia, además de que, una vez que se ha generado el hibridoma deseado, se pueden preservar como un recurso constante y renovable (LIPMAN *et al.*, 2005; SHEPARD *et al.*, 2017). En contraste, los pAbs generados para el mismo antígeno usando múltiples animales diferirán entre los animales inmunizados, y sus características pueden cambiar a medida que se recolectan con el tiempo. Aparte, la cantidad de pAbs obtenidos está limitada por el tamaño del animal y su vida útil (LIPMAN *et al.*, 2005). Uno de los anticuerpos monoclonales terapéuticos más destacado es trastuzumab, utilizado en el tratamiento del cáncer de mama junto a la quimioterapia. Este medicamento se aprobó para su uso médico en 1998, y hoy en día sigue teniendo un gran impacto en la vida de las pacientes de este cáncer. De hecho, consta como uno de los medicamentos fundamentales en un sistema sanitario eficaz según la 21ª lista de medicamentos esenciales de la OMS, publicada en 2019.

1. 5. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Gracias a la tecnología del DNA recombinante, se pudieron desarrollar los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados; e inicialmente todos los anticuerpos monoclonales recombinantes utilizados en terapia presentaban la estructura convencional de los anticuerpos (BREEDVELD, 2000; SHEPARD *et al.*, 2017). Sin embargo, más recientemente se han generado diseños de anticuerpos terapéuticos que no poseen las características estructurales naturales (AHMAD *et al.*, 2012). Los formatos de anticuerpos recombinantes con estructuras artificiales más comunes son los fragmentos Fab, los scFv, y los anticuerpos biespecíficos (MA Y O'KENNEDY, 2015; BASU *et al.*, 2019). Los fragmentos Fab consisten en dos sets de dominios variables y constantes del anticuerpo (uno de cada cadena), es decir, en los dominios VH, CH1, VL, CL; que forman una estructura estable compuesta por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Por otro lado, los anticuerpos biespecíficos, como su propio nombre indica, reúnen dos especificidades distintas y son capaces de unirse a dos antígenos diferentes a la vez (BASU *et al.*, 2019). Durante los últimos años, ha aumentado notablemente el interés en los scFv, en los cuales las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo (VH y VL) son fusionadas mediante una secuencia de unión flexible (Figura 4), reconstituyendo el sitio de unión al antígeno (AHMAD *et al.*, 2012; BASU *et al.*, 2019). La simplicidad de esta molécula la hace particularmente apropiada para ser producida en sistemas de expresión bacterianos con elevada eficiencia; y cada vez se usan más como reactivos en ensayos inmunodiagnósticos. Asimismo, existen varios medicamentos derivados de scFv que están ya aprobados por la FDA (AHMAD *et al.*, 2012).

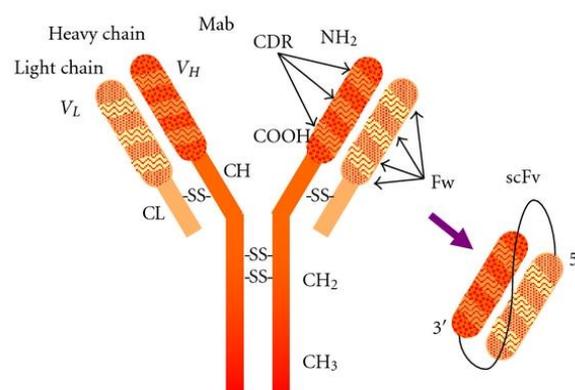


Figura 4. Distribución de los dominios de un anticuerpo y generación de un scFv. El anticuerpo de cadena simple de fragmento variable (scFv) generado con la tecnología de anticuerpos recombinantes aparece en la esquina inferior derecha. CH: dominio constante de la cadena pesada; VH: dominio variable de la cadena pesada; CL: dominio constante de la cadena ligera; VL: dominio variable de la cadena ligera; CDR: regiones determinantes de complementariedad; Fw: regiones marco o de entramado (AHMAD *et al.*, 2012).

En lo que respecta a la producción de R-mAbs, consta fundamentalmente de los siguientes pasos: en primer lugar, se determina la secuencia que codifica para el anticuerpo deseado, posteriormente se seleccionan y clonan los genes de interés y se genera un constructo (SIEGEL, 2002). Por ejemplo, si se quiere producir un scFv será necesario sintetizar los genes que codifican para los dominios VH y VL; en cambio, para producir un fragmento Fab, se clonarán los genes que codifican para los dominios VH, CH1, VL y CL del anticuerpo de interés. Una vez llegados a este punto, se genera un vector de expresión y se transfecta un huésped (líneas celulares de bacterias, levaduras o mamíferos) en el que se sintetizará el anticuerpo recombinante funcional (SIEGEL, 2002; BASU *et al.*, 2019).

Para producir R-mAbs, se pueden distinguir dos métodos principales: en primer lugar, y siendo esta la opción más utilizada, se pueden generar *de novo* a partir de bibliotecas de anticuerpos derivadas de animales inmunizados o no inmunizados, combinada con la selección de los R-mAbs de interés *in vitro* (VIDARSSON *et al.*, 2014). Esta técnica se denomina "*repertoire cloning*" o "*Fab/phage display*", y consiste básicamente en la clonación rápida de genes de inmunoglobulina para crear bibliotecas de las cuales se pueden seleccionar los anticuerpos con las especificidades deseadas para cada caso. En esta tecnología, las regiones variables son fusionadas al dominio N-terminal de la proteína estructural PIII del bacteriófago M13. Así, es posible producir una colección de fagos (de un millón a diez mil millones de clones diferentes) donde cada virus filamentoso exponga en su superficie una sola región variable, con una única especificidad antigénica. Los fagos obtenidos a partir de la genoteca pueden ser seleccionados mediante la unión del anticuerpo a un antígeno de interés *in vitro*. Así pues, este enfoque facilita el aislamiento y la producción de anticuerpos, sin la necesidad de transformación de células B, cultivo de tejidos o incluso individuos inmunizados (SIEGEL, 2002).

Por otro lado, los R-mAbs también pueden generarse a partir de líneas celulares de hibridoma existentes, que expresan mAbs bien caracterizados, siempre que haya cebadores o sondas de hibridación apropiadas disponibles; y una vez creado el vector de expresión se puede producir el anticuerpo en una línea celular estable (VIDARSSON *et al.*, 2014). Este es el caso de los cinco anticuerpos sobre los que versa este proyecto. Los cinco anticuerpos que se van a producir y caracterizar fueron generados a partir de hibridomas por ANDREWS *et al.* (2019). Para generarlos, se extrajo el RNA de los hibridomas criopreservados de interés, y se sintetizó el cDNA, mediante RT-PCR, de las secuencias que codifican para las regiones VH y VL de las Igs. A partir del molde de cDNA se amplificaron los dominios VH y VL utilizando cebadores desarrollados por CROSNIER *et al.* (2010). Finalmente, las regiones VH y VL producto de la PCR se utilizaron como molde para realizar una F-PCR y fusionar estas regiones con un fragmento del plásmido p1316, generando así un vector de expresión para una IgG completa que presenta los dominios VH y VL seleccionados (ANDREWS *et al.*, 2019).

1. 6. VENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Si comparamos las características de los anticuerpos recombinantes con las de los anticuerpos monoclonales, que son los mayoritariamente usados en investigación hoy en día, vemos que los primeros presentan una serie de ventajas. En primer lugar, los anticuerpos recombinantes permiten mayor reproducibilidad y control, ya que, a diferencia de los anticuerpos monoclonales que se producen utilizando los métodos tradicionales basados en hibridoma, los anticuerpos recombinantes no los necesitan para ser producidos (ANDREWS *et al.*, 2019; BASU *et al.*, 2019). Los hibridomas son células genéticamente inestables que a menudo pierden la capacidad de producir

anticuerpos o dejan de ser viables tras un período limitado de tiempo. Por el contrario, los R-mAbs no corren el riesgo de la pérdida por inestabilidad genética de las células de hibridoma tetra o hexaploides (SIEGEL, 2002; ANDREWS *et al.*, 2019). Además, las líneas celulares de hibridoma pueden expresar múltiples cadenas funcionales de inmunoglobulinas (tanto ligeras como pesadas), mientras que la expresión recombinante asegura la producción de un único R-mAb molecularmente definido (MA Y O'KENNEDY, 2015; ANDREWS *et al.*, 2019; BASU *et al.*, 2019) y, como consecuencia, los R-mAbs son más específicos que los mAbs tradicionales. Por esta misma razón, son más confiables y proporcionan resultados más reproducibles que los mAbs.

En segundo lugar, la expresión recombinante puede producir niveles de producción cientos o incluso miles de veces más altos de lo que es posible con expresiones endógenas de mAbs de células de hibridoma (GROFF *et al.*, 2020), lo cual es muy interesante desde el punto de vista de la producción a nivel industrial. Asimismo, la clonación de R-mAbs permite crear un archivo permanente, confiable y económico del R-mAb como DNA plasmídico y secuencias de ácido nucleico frente a un sistema de archivo que depende de la costosa criopreservación de las líneas celulares de hibridoma en nitrógeno líquido, así como de su posterior recuperación.

Por otro lado, hay una disminución significativa del tiempo de producción de los anticuerpos. Usando la tecnología de anticuerpos recombinantes, se puede producir un anticuerpo específico para un antígeno en tan solo ocho semanas. Por el contrario, los hibridomas requieren un mínimo de cuatro meses para producir un anticuerpo funcional. Otra ventaja es que un R-mAb puede convertirse fácilmente en una especie, isotipo o subtipo diferente agregando el dominio constante apropiado (ANDREWS *et al.*, 2019). Esto facilita el cambio de anticuerpos al formato que se prefiera en un experimento determinado. Actualmente, la técnica más ampliamente utilizada para este fin es la construcción de genotecas de regiones variables de anticuerpos o *repertoire cloning*, previamente mencionado (SIEGEL, 2002; VIDARSSON *et al.*, 2014).

Por último, es una tecnología que no necesita inmunizar animales. Los anticuerpos recombinantes se pueden producir sin usar ningún animal en el proceso y esto elimina las numerosas preocupaciones éticas y de bienestar animal comúnmente asociadas con la producción tradicional de anticuerpos monoclonales (SIEGEL, 2002; ANDREWS *et al.*, 2019).

1. 7. ANTICUERPOS EN NEUROBIOLOGÍA

Uno de los retos más importantes en neurobiología es entender y caracterizar completamente los mecanismos responsables de la formación, mantenimiento y modificación de la sinapsis. Si bien hay excepciones, la aplicación de procedimientos inmunológicos a estudios sobre las sinapsis se ha visto históricamente limitada por la necesidad de utilizar moléculas altamente purificadas (REICHARDT Y MATTHEW, 1982). Utilizando anticuerpos derivados de la expresión recombinante, se asegura la producción de un único R-mAb molecularmente definido y representarían una herramienta sumamente útil en neurobiología. Además, también nos podemos beneficiar del resto de ventajas que los R-mAbs presentan respecto a los mAbs tradicionales previamente descritas, destacando su muy elevada reproducibilidad y la optimización de la relación coste-beneficio. Por otro lado, cabe mencionar que los R-mAbs también son prometedores como agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas, como se describe en MANOUTCHARIAN *et al.* (2017). En este proyecto, se llevará a cabo la producción y caracterización de cinco anticuerpos monoclonales recombinantes contra cinco proteínas cuyo interés en neurobiología radica en que pueden funcionar como marcadores de la sinapsis.

En primer lugar, un anticuerpo contra la proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) de la medusa *Aequorea victoria*. Este anticuerpo anti-GFP resulta extremadamente útil, no solo en el campo de la neurobiología, sino en prácticamente cualquier laboratorio de investigación, por sus numerosas aplicaciones. Destaca su uso como marcador fusionado a polipéptidos que permite monitorizar la localización de proteínas. En el ámbito de la neurobiología, cabe resaltar el arco iris cerebral o *rainbow*; una técnica de marcaje celular donde se generan cientos de colores con matices diferentes mediante la expresión de proteínas fluorescentes derivadas de la GFP, permitiendo así el mapeo del circuito nervioso (WEISSMAN Y PAN, 2015).

En segundo lugar, un anticuerpo contra el receptor de glutamato 1 (GluR1), una proteína postsináptica codificada por el gen GRIA1. Los receptores de glutamato son los receptores neurotransmisores excitadores predominantes en el cerebro de los mamíferos y se activan en una gran variedad de procesos neurofisiológicos normales (LU *et al.*, 2004). A nivel estructural, son complejos de proteínas heteroméricas con múltiples subunidades, cada una de las cuales posee regiones transmembrana, y todas están dispuestas para formar un canal iónico dependiente de ligando. El mRNA del GRIA1 humano está presente en las células granulares y piramidales en la formación del hipocampo (MCNAMARA *et al.*, 1992); y dicho gen está involucrado principalmente en la plasticidad sináptica, reduciéndose significativamente la expresión de GluR1 en la corteza frontal humana con el aumento de la edad (LU *et al.*, 2004).

En tercer lugar, un anticuerpo contra la proteína de densidad postsináptica 95 (*postsynaptic density protein 95*). PSD-95 es un miembro de la familia de las guanilato quinasas asociadas a la membrana, e interviene en sitios postsinápticos en la formación de un armazón multimérico para la agrupación de receptores, canales iónicos y proteínas de señalización asociadas, es decir, es una proteína de andamiaje. Es vital en la plasticidad sináptica y en la estabilización de los cambios sinápticos durante la potenciación a largo plazo (MEYER *et al.*, 2014).

En cuarto lugar, un anticuerpo contra la proteína ankirina-G (Ank-G), la cual se encuentra en las uniones neuromusculares, el segmento inicial de los axones y en los nódulos de Ranvier (HEDSTROM *et al.*, 2007; FREAL *et al.*, 2016; NELSON *et al.*, 2018). En cuanto a su función, dentro de los nódulos de Ranvier, donde los potenciales de acción se propagan activamente, se ha pensado durante mucho tiempo que la proteína Ank-G es la molécula de unión intermedia para la neurofascina y los canales de sodio dependientes de voltaje (HEDSTROM *et al.*, 2007); además de ser vital para el correcto desarrollo del segmento inicial del axón (FREAL *et al.*, 2016). Por otro lado, la eliminación de Ank-G en múltiples tipos de neuronas ha demostrado que dicha proteína es necesaria para la agrupación normal de los canales de sodio dependientes de voltaje en el cono axónico y para la activación del potencial de acción (HEDSTROM *et al.*, 2007).

En quinto y último lugar, un anticuerpo contra el transportador vesicular de glutamato 1 (VGluT1), una proteína presináptica. Se trata de un transportador de fosfato dependiente de sodio que se expresa específicamente en las regiones del cerebro ricas en neuronas glutamatérgicas excitadoras (TAKAMORI *et al.*, 2000), y que se asocia preferentemente con las membranas de las vesículas sinápticas interviniendo en el transporte de glutamato (EASTWOOD Y HARRISON, 2005).

Finalmente, cabe remarcar que los cinco anticuerpos descritos que se producirán son anticuerpos monoclonales recombinantes que presentan la región constante propia del isotipo IgG de ratón. Para ser más precisos, los anticuerpos anti-GFP y anti-PSD-95 pertenecen al alotipo IgG2a, mientras que los anticuerpos anti-GluR1, anti-Ank-G y anti-VGluT1 pertenecen al alotipo IgG1 (Andrews *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente proyecto es la producción y caracterización de cinco anticuerpos monoclonales recombinantes, capaces de reconocer las proteínas GFP, GluR1, PSD-95, Ank-G y VGluT1; funcionando como marcadores neuronales y de las conexiones sinápticas. Así pues:

1. Se pondrá a punto un protocolo para la producción óptima de dichos anticuerpos.
2. Se validará su correcto funcionamiento en neurobiología.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1. EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO

Los plásmidos para la expresión de los anticuerpos recombinantes se obtuvieron de Addgene®, donde fueron depositados por James Trimmer (UC Davis, CA, EEUU) (ANDREWS *et al.*, 2019).

En los cinco casos, las células transformadas con el plásmido recombinante fueron células DH5-alpha. Se trata de células de *E. Coli* modificadas genéticamente para maximizar la eficiencia de la transformación (CHAN *et al.*, 2013). Otro aspecto común a los cinco plásmidos es que contienen el gen de resistencia a la ampicilina para seleccionar las bacterias transformadas (Tabla 1). Se aisló el DNA plasmídico a pequeña y mediana escala mediante cromatografía de afinidad.

Tabla 1. Características de los plásmidos codificantes para los anticuerpos recombinantes. Inserto que contienen, referencia, cepa bacteriana, gen de resistencia bacteriana y temperatura (Tª) óptima para el crecimiento bacteriano.

Plásmido	Inserto	Referencia	Cepa bacteriana	Resistencia bacteriana	Tª de crecimiento
N355/1R	anti-GluR1	Addgene_114483	DH5alpha	Ampicilina	37°C
N86/38.1R	anti-GFP	Addgene_114492	DH5alpha	Ampicilina	37°C
K28/43R	anti-PSD-95	Addgene_128618	DH5alpha	Ampicilina	37°C
N106/43R	anti-Ank-G	Addgene_128635	DH5alpha	Ampicilina	37°C
N28/9R	anti-VGluT1	Addgene_128638	DH5alpha	Ampicilina	37°C

3. 1. 1. EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO A PEQUEÑA ESCALA

Para purificar el DNA plasmídico a pequeña escala, se siguió el protocolo facilitado por el kit NZYMiniprep® (NZYTech Lda., Lisboa, Portugal), con referencia MB010, con modificaciones puntuales. Para cada plásmido se siguieron los siguientes pasos:

Para empezar, se prepararon 10 mL de caldo de lisogenia o medio LB (por su nombre en inglés, *Lysogeny broth*) (10 g de NaCl/L, 10 g de triptona/L, 5 g de extracto de levadura/L y agua milli Q) en un matraz de 50 mL y se añadió ampicilina a dilución 1:1000, es decir, 10 µL. La colonia de bacterias que contenía el plásmido se conservaba ultracongelada a -80°C en un tubo eppendorf. Para transferir las bacterias al medio se picó la colonia con una punta de pipeta y se introdujo el glicerinado en el matraz con medio LB. Posteriormente, los cinco matraces se incubaron durante 18 horas en agitación a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó el cultivo bacteriano a 6000 rpm durante 8 minutos a Tª ambiente y se decantó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 250 µL de tampón A1 utilizando vórtex, en un tubo eppendorf. Se añadieron 250 µL de tampón A2 y se homogeneizó el lisado celular invirtiendo el tubo 8 veces. Se incubó a temperatura ambiente durante 4 minutos y se añadieron 300 µL del tampón A3, volviendo a invertir el tubo 8 veces. Para clarificar el lisado, se realizó una centrifugación de 10 minutos a 14500 rpm y a Tª ambiente, utilizando la centrífuga Eppendorf miniSpin plus (referencia Z606235 de Sigma-Aldrich™, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

El sobrenadante resultante se añadió a la columna de cromatografía y se centrifugó a 11000 rpm durante un minuto. Después, se lavó la columna para evitar posible contaminación del material genético con 500 µL del tampón AY, y se repitió la centrifugación inmediatamente anterior. A esto le siguió otra centrifugación idéntica de un minuto tras añadir tampón A4 con etanol. Para secar la membrana microporosa de sílice, se centrifugó durante 2 minutos a 11000 rpm.

Finalmente, para eluir el DNA, se introdujo la columna en un tubo de 1.5 mL nuevo y se añadieron a la columna 50 μ L del tampón de elución AE. Se incubó a temperatura ambiente durante un minuto, y después se centrifugó durante otro minuto para recoger el eluido. Este último paso se repitió con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción. Para determinar la concentración del DNA purificado de los diferentes plásmidos, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU) (Tabla 2). Las cinco muestras se guardaron para su posterior uso a -20°C.

Tabla 2. Concentración del DNA plasmídico purificado.

Plásmido	Inserto	Referencia	Concentración (μ g/ μ L)
N355/1R	anti-GluR1	Addgene_114483	0.816
N86/38.1R	anti-GFP	Addgene_114492	0.956
K28/43R	anti-PSD-95	Addgene_128618	0.811
N106/43R	anti-Ank-G	Addgene_128635	0.835
N28/9R	anti-VGluT1	Addgene_128638	0.680

3. 1. 2. EXTRACCIÓN DEL DNA PLASMÍDICO A MEDIANA ESCALA

Para purificar el DNA plasmídico a pequeña escala, se siguió el protocolo facilitado por el kit NZYMaxiprep® (MB051, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal) con modificaciones puntuales. Para cada plásmido se siguieron los siguientes pasos:

Se prepararon 1000 mL de medio LB en un matraz de 2 L y se añadió ampicilina a dilución 1:1000, es decir, 1 mL. A su vez, se preparó 1 mL de medio LB con 1 μ L de ampicilina en un tubo eppendorf. La bacteria ultracongelada se introdujo en dicho tubo para preparar un preinóculo y se dejó incubar durante 3 horas en agitación a 37°C. Posteriormente, se traspasó el preinóculo bacteriano al matraz de 2L con 1L de medio LB y se incubó durante 18 horas en agitación a 37°C. A continuación, se centrifugó el cultivo bacteriano a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se usó la centrífuga Sorvall™ LYNX™ 6000 Superspeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU).

El pellet resultante se resuspendió en 12 mL de tampón M1 con RNasa A en un tubo Falcon de 50 mL, con el fin de lisar las células; y se homogeneizó utilizando un vórtex. Se añadió a continuación tampón M2, mezclando mediante inversión 5 veces, y se incubó a Tª ambiente durante 5 minutos. Después, se añadieron 12 mL de tampón neutralizante M3 previamente enfriado en hielo y se mezcló invirtiendo el tubo 15 veces. Paralelamente, se equilibró la columna utilizando 6 mL del tampón MEQ, dejándose vaciar por gravedad. El lisado se centrifugó a 16000 rpm durante 40 minutos a 4°C, utilizando la centrífuga Avanti® JXN-26 y el rotor JA-25.50 (Beckam Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, EEUU). El sobrenadante (que contiene el DNA) se añadió a la columna equilibrada y se dejó vaciar mediante flujo por gravedad. Así pues, una vez unido el DNA a la resina con carga positiva de la columna, esta se lavó con 32 mL del tampón MW para eliminar los posibles contaminantes. A continuación, se eluyó el DNA con 15 mL del tampón ME. Se dejó vaciar la columna mediante flujo por gravedad y se recogió el eluido en un tubo Falcon nuevo.

Para precipitar el DNA, se añadieron 10.5 mL de isopropanol a Tª ambiente. Tras mezclarlo se dejó reposar durante 2 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 4°C en la centrífuga Avanti® JXN-26 y se decantó el sobrenadante. Se añadieron 5 mL de etanol al 70% a Tª ambiente al pellet, y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos a Tª ambiente en la

centrífuga Avanti® JXN-26. En este caso, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente utilizando una pipeta y se dejó sacar el pellet a T^a ambiente. Finalmente, para reconstituir el DNA plasmídico, se utilizaron 100 µL de tampón TE y para determinar su concentración se usó el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU). Las muestras se guardaron para su posterior uso a -20°C.

3. 2. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para seleccionar los enzimas de restricción, se realizó un análisis *in silico* utilizando la herramienta NEBcutter® V2.0 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU).

El tampón utilizado para la digestión en todos los casos fue NEBuffer®3.1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU). La reacción tuvo lugar durante una hora a 37°C y el mix de digestión consistió en: 0.7 µL de DNA plasmídico + 0.5 µL de tampón NEBuffer®3.1 + 0.5 µL del enzima correspondiente + 48.3 µL de agua milli Q. Así pues, se dispusieron nueve preparaciones de digestión enzimática distintas (Tabla 3).

Para la electroforesis se utilizaron dos geles de agarosa: uno al 1% y otro al 0,8%. Para la preparación de dichos geles se procedió de la siguiente manera: Se prepararon 40 mL de tampón TE al 10% y se añadieron 0.4 g de agarosa (referencia 801900, Sumilab S.L., Valencia, España) en el caso del gel al 1% y 0.32 g en el caso del gel al 0.8%. Después, se calentó la mezcla en un microondas y se añadió 1 µL del colorante GelRed® (Biotium Inc., Hayward, CA, EEUU). Se dejó enfriar y gelificar. Una vez preparado el gel, se cargaron 15 µL de cada mix de digestión, 15 µL de cada plásmido no digerido (preparado con 0.7 µL de DNA plasmídico + 10 µL de tampón de carga + 39.3 µL de agua milli Q) y 5 µL del marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III® con referencia MB04401(NZYTEch Lda., Lisboa, Portugal).

Tabla 3. Enzima(s) de restricción utilizado(s) para cada plásmido.

Plásmido	Inserto	Referencia	Enzima(s)
N355/1R	anti-GluR1	Addgene_114483	BamHI, BglII
N86/38.1R	anti-GFP	Addgene_114492	EcoRV, BglII
K28/43R	anti-PSD-95	Addgene_128618	BglII
N106/43R	anti-Ank-G	Addgene_128635	BamHI, BglII
N28/9R	anti-VGluT1	Addgene_128638	BamHI, BglII

3. 3. CULTIVOS CELULARES

3. 3. 1. LÍNEAS CELULARES COS-7 Y HEK 293T

Las células COS-7 (ATCC® CRL-1651™, American Type Culture Collection) y HEK 293T (ATCC® CRL-3216™, American Type Culture Collection) utilizadas se encontraban a un pase superior a 10 conservadas en nitrógeno líquido. Para descongelarlas, se calentaron en un baño de agua desionizada tipo II a 37°C, tras lo cual se cogió 1 mL de células descongeladas y se añadió a 9 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de Fisher Scientific™ (referencia 31600083, de Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU), en un vial Falcon de 15 mL. A continuación, la suspensión celular se centrifugó a 100 g durante 10 minutos a T^a ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de medio DMEM al pellet y se sembró este mismo volumen de células resuspendidas en una placa petri p100 de 55 cm², añadiendo 9 mL de medio DMEM.

Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM, suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal inactivado por calor (FBS, 10735086001, Sigma-Aldrich™, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y L-glutamina al 1% (31095029, Fisher Scientific™). Con el paso del tiempo, tiene lugar un empobrecimiento del medio al consumirse los nutrientes y acumularse productos de deshecho. Para evitar la senescencia celular por acumulación de productos de degradación y el agotamiento del medio, cuando las células presentaban una confluencia del 90% se levantaban y se volvían a sembrar, más diluidas, en medio fresco. Se utilizó tampón fosfato salino (PBS, 18912014, Fisher Scientific™) para lavar las células y tripsina (tripsina-EDTA Gibco®, 25300054, Fisher Scientific™) para despegarlas de la placa petri, ya que se trata de cultivos adherentes. En el caso de las células COS-7, la tripsinización dura 60 segundos; mientras que para las células HEK 293T bastan 30 segundos. Cabe mencionar que el medio de cultivo celular inactiva la tripsina, y por ello es necesario lavar las células con PBS antes de tratarlas con tripsina.

3. 3. 2. CULTIVO NEURONAL PRIMARIO

Por otro lado, las neuronas se obtuvieron de cerebro de embriones de ratón (E15) mediante disgregación mecánica y enzimática, utilizando tripsina. Se sembraron 100 000 células en cada pocillo de una placa de 12 pocillos (3.8 cm²/pocillo) pretratadas con poli-L-lisina (P2636, Sigma-Aldrich™). El medio de cultivo utilizado fue medio neurobasal suplementado con B-27 al 2%, Glutamax 200 mM al 0.5% y penicilina-estreptomicina al 1% (con referencias 21103049, 17504044, 35050038 y 15140122 de Fisher Scientific™ respectivamente). Cuando el medio se tornaba anaranjado, éste se cambiaba por medio fresco para reponer los nutrientes y eliminar los productos de degradación, evitando así la senescencia celular (se quita la mitad del medio en el que están las neuronas y se repone con medio fresco). Esta renovación del medio se llevó a cabo aproximadamente cada 48 o 72 horas, dependiendo de la confluencia que presentasen las células.

3. 4. TRANSFECCIÓN

Las líneas celulares COS-7 y HEK 293T fueron transfectadas (i) para producir los anticuerpos de interés y (ii) para comprobar su correcto funcionamiento. En el primer caso, se transfectaron con el DNA plasmídico purificado en el apartado “3. 1. Extracción del DNA plasmídico”. Para comprobar su funcionamiento, se transfectaron las células con las proteínas objetivo, utilizando su DNA plasmídico codificante. No obstante, no hay plásmidos disponibles para las proteínas Ank-G y GluR1, por lo que los anticuerpos recombinantes que las detectan hubieron de ser probados directamente en cultivo neuronal primario, sin analizar su rendimiento en línea celular.

Para el resto de las proteínas objetivo: GFP, PSD-95 y VGluT1; se utilizaron respectivamente los siguientes plásmidos que las codifican: CMV-GFP-IRES-CRE (donado por Fred Gage (Addgene plasmid #49056; <http://n2t.net/addgene:49056>; RRID: Addgene_49056)); PSD-95-pTagRFP (donado por Johannes Hell (Addgene plasmid #52671; <http://n2t.net/addgene:52671>; RRID: Addgene_52671)), y pCAG vGluT1 mCherry (donado por Franck Polleux (Addgene plasmid #105010; <http://n2t.net/addgene:105010>; RRID: Addgene_105010)). Los tres fueron adquiridos a través de Addgene® (referencias 49056, 52671 y 105010 respectivamente). Se realizó una extracción a mediana escala del DNA de cada uno de ellos siguiendo el protocolo previamente descrito utilizando el kit NZYMaxiprep® (MB051, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal). Después, se ajustó la concentración de DNA de cada una de las tres muestras a 1 µg/ µL.

En primer lugar, para expresar los anticuerpos, se sembraron células COS-7 y HEK 293T en dos placas de 6 pocillos de 9.5 cm² (6 pocillos de cada tipo celular); en 1.5 mL del medio de cultivo

descrito en el apartado anterior, añadiendo un 1% de penicilina-estreptomina. Una vez que las células llegaron a una confluencia de aproximadamente un 30%, se llevó a cabo la transfección utilizando polietilenamina (PEI). La PEI (23966-1, Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Alemania) es un polímero catiónico sintético que presenta un gran número de aminas secundarias y terciarias que son capaces de absorber los hidrones (H⁺), impidiendo la acidificación del endosoma, de manera que la acumulación de iones cloruro acaba resultando en la rotura del endosoma y se consigue la internalización del DNA plasmídico (SUNSHINE *et al.*, 2011).

Cada pocillo se transfectó con el DNA que produce un anticuerpo distinto y el pocillo restante se transfectó con el plásmido que codifica para la proteína fluorescente GFP (plásmido CMV-GFP-IRES-CRE; KASPAR *et al.*, 2002) como control, permitiendo además la monitorización *in vivo* del ratio de transfección mediante microscopía de fluorescencia.

El protocolo seguido fue el siguiente: se dejaron 1000 μ L de medio de cultivo en cada pocillo, y se calculó el volumen necesario de DNA de cada plásmido para tener 1 μ g de material genético (Tabla 4). Se prepararon por separado 125 μ L de DMEM sin suero a los que se le añadieron 1 μ g de DNA (disolución A), y otros 125 μ L de DMEM (también sin suero) a los que se le añadieron 6 μ L de PEI (disolución B) para cada plásmido (la relación DNA:PEI debe ser 1 μ g:6 μ L). Después de mezclar cada disolución A con su correspondiente disolución B utilizando el vórtex, se dejó reposar media hora y luego las mezclas se añadieron a los pocillos correspondientes gota a gota. A las 4 horas se cambió el medio de transfección por 1.5 mL de medio DMEM suplementado con FBS y L-glutamina.

Tabla 4. Volumen necesario de DNA plasmídico para la transfección. Volúmenes de DNA plasmídico utilizados para la transfección de un pocillo de 9.5 cm².

Plásmido	Inserto	Referencia	Concentración (μ g/ μ L)	Volumen (μ L) equivalente a 1 μ g de DNA
N355/1R	anti-GluR1	Addgene_114483	0.816	1.23
N86/38.1R	anti-GFP	Addgene_114492	0.956	1.05
K28/43R	anti-PSD-95	Addgene_128618	0.8105	1.23
N106/43R	anti-Ank-G	Addgene_128635	0.835	1.20
N28/9R	anti-VGluT1	Addgene_128638	0.6804	1.47
CMV-GFP-IRES-CRE	GFP	Addgene_49056	1	1.00

Los plásmidos están diseñados de manera que las células expulsan los anticuerpos recombinantes al medio después de sintetizarlos. La proteína GFP sintetizada también se acaba secretando al medio de cultivo. Así pues, el sobrenadante de cada pocillo se recogió a las 48 horas y a las 72 horas de la transfección, y ambos sobrenadantes recogidos se juntaron. Se añadió azida al 0.02% para evitar posible contaminación bacteriana.

Para comprobar la funcionalidad de los anticuerpos producidos se transfectaron placas de 12 pocillos de 3.8 cm² con las proteínas objetivo. Para producir el anticuerpo anti-GFP a mediana escala se transfectaron frascos de 75 cm². En ambos casos se siguió el protocolo de transfección descrito arriba, pero cambiando las cantidades de los reactivos utilizados de manera directamente proporcional al área disponible (Tabla 5). Los anticuerpos producidos a mediana escala también se recogieron a las 24 y a las 48 horas y se juntaron ambas recolecciones.

Tabla 5. Cantidades de los reactivos usados en el protocolo de transfección. Cantidad de cada reactivo utilizado dependiendo del área del recipiente en el que se siembran las células.

Área	DMEM suplementado (μL)	Solución A		Solución B	
		DMEM sin suero (μL)	DNA (μg)	DMEM sin suero (μL)	PEI (μL)
3.8 cm ²	400	50	0.4	50	2.4
9.5 cm ²	1000	125	1	125	6
75 cm ²	15000	987	7.9	987	47.4

En cultivo neuronal primario, la proteína GFP no se expresa de forma endógena, por lo que fue transfectada mediante electroporación, utilizando el plásmido CMV-GFP-IRES-CRE (KASPAR *et al.*, 2002). Se utilizaron neuronas D8 para comprobar la eficacia del anticuerpo anti-GFP mediante inmunofluorescencia indirecta.

3. 5. WESTERN BLOT

Para el análisis de la expresión de los anticuerpos mediante Western blot (WB), se utilizó un gel de poliacrilamida-SDS al 8% para desnaturalizar las proteínas (agua milli Q; Tris 1.5M pH 8.8; Tris 0.5M pH 6.8; SDS 10%; APS 10%; TEMED). Las muestras (el sobrenadante que contiene los cinco anticuerpos producidos en ambas líneas celulares y el sobrenadante que contiene la proteína GFP, que funcionará como control, en total doce muestras) se calentaron durante 10 minutos a 95°C, y posteriormente se dejaron 5 minutos en hielo. Se realizaron dos WB: en el primero se cargaron en el gel 5 μL de cada muestra (4 μL de sobrenadante + 1 μL de tampón de carga con β-mercaptoetanol) y en el segundo 35 μL de cada muestra (28 μL de sobrenadante + 7 μL de tampón de carga con β-mercaptoetanol). Como marcador de peso molecular se utilizaron 5 μL de PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™ de Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU; referencia 26616). La electroforesis se llevó a cabo a un amperaje constante de 35 mA y a máximo voltaje, durante 3 horas y 30 minutos a temperatura ambiente y en presencia de un tampón de migración (25mM Tris; 190mM glicina; 0.1% SDS; pH 8.3). A continuación, se realizó una transferencia gel-membrana en medio húmedo: el gel y la membrana, en este caso de polifluoruro de vinilideno (PVDF), se intercalan y fijan firmemente entre finas esponjas y papel absorbente Whatman® (Fisher Scientific™). La membrana de PVDF ha de ser pretratada con metanol, y el montaje tipo sándwich se sumerge en un compartimento que contiene el tampón de transferencia (25mM Tris, 190mM Glicina) donde se aplica a continuación la corriente eléctrica a un voltaje constante de 30V (electrotransferencia) a T^a ambiente.

La eficacia de la transferencia se comprobó tiñendo la membrana con Ponceau S (23966-1, Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Alemania). Para eliminar esta tinción se utilizó TBS-T (Tris Buffered Saline (TBS) + Tween (T) 0.05%). Después, la membrana se bloqueó utilizando BSA 2% (albúmina de suero bovino) durante 2 horas T^a ambiente. Una vez bloqueada la membrana, se procedió a incubarla con anticuerpo anti-ratón marcado con el enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) (referencia 62-6520 de Fisher Scientific™) a dilución 1:2000; durante 1 hora a T^a ambiente y en agitación. Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados consecutivos de 10 minutos a T^a ambiente y en agitación con TBS-T. Para el revelado se utilizaron 1.4 mL de luminol (A8511-5G, Sigma-Aldrich™).

3. 6. INMUNOCITOQUÍMICA

Las células COS-7 se utilizaron para los ensayos inmunocitoquímicos 48 horas después de la transfección con las proteínas objetivo que se ha descrito previamente. Por otro lado, se utilizaron neuronas D8 transfectadas con GFP para comprobar la eficiencia del anticuerpo anti-GFP; y neuronas D14 para testar el resto de los anticuerpos, ya que se da una sinapsis más madura y se pueden detectar con mayor fiabilidad y facilidad las proteínas neuronales endógenas objetivo. Los anticuerpos recombinantes producidos se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta.

Se realizaron ensayos inmunocitoquímicos siguiendo un protocolo ya establecido (FAZZARI *et al.*, 2014), que se describe brevemente a continuación: para empezar, las células se fijaron utilizando paraformaldehído 4% (158127, Sigma-Aldrich™) durante 10 minutos a T^a ambiente. Seguidamente se realizaron tres lavados consecutivos de 10 minutos con PBS. Las células se permeabilizaron usando PBS con 0,1% Triton durante 10 minutos, y se lavaron dos veces durante 5 minutos con PBS. Para evitar la unión inespecífica, se añadió PBS con BSA 2% durante 2 horas a T^a ambiente. Para marcar los núcleos se utilizó DAPI a dilución 1:2000 (D9542, Sigma-Aldrich™). Como anticuerpo primario, se utilizaron los anticuerpos recombinantes producidos a dilución 1:1, excepto en el caso del anticuerpo anti-GFP, que se utilizó a diferentes diluciones especificadas en la Tabla 6 y en el apartado de resultados. Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la Tabla 6 y todos se usaron a dilución 1:500. Todos los anticuerpos secundarios son anticuerpos anti-ratón conjugados Alexa Fluor®. Tras la tinción, los cubres se montaron con Mowiol (81381, Sigma-Aldrich™). Se prepararon dos réplicas técnicas de cada ensayo.

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos inmunocitoquímicos. Se especifica cuáles se utilizaron en células COS-7 y cuáles en neuronas, así como a qué concentración se utilizaron.

Células COS-7		
Anticuerpos primarios	Dilución	Referencia
anti-GFP	1:1 ; 1:5	Addgene_114492 (plásmido)
anti-PSD-95	1:1	Addgene_128618 (plásmido)
anti-VGLuT1	1:1	Addgene_128638 (plásmido)
Anticuerpos secundarios	Dilución	Referencia
Alexa Fluor® 488	1:500	
Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG2a	1:500	A-21137, Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor® 647 donkey anti-mouse	1:500	A-31571, Life Technologies
Neuronas		
Anticuerpo primario	Dilución	Referencia
anti-GluR1	1:1	Addgene_114483 (plásmido)
anti-GFP	1:1 ; 1:2 ; 1:10 ; 1:50	Addgene_114492 (plásmido)
anti-Ank-G	1:1	Addgene_128635 (plásmido)
Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
Alexa Fluor® 488	1:500	A-21202, Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG2a	1:500	A-21137, Thermo Fisher Scientific

Cabe mencionar que los anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 y Alexa Fluor® 647 reconocen cualquier IgG de ratón, mientras que el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 555 reconoce específicamente el alotipo IgG2a. Los anticuerpos anti-GFP y anti-PSD-95 pertenecen a dicho

alotipo, y, al ser los dos más utilizados de los cinco producidos en investigación neurobiológica, se comprobó si la especificidad del anticuerpo secundario mejoraba la detección de la proteína objetivo al usarse con estos dos anticuerpos primarios, es decir, si se producía una amplificación de la señal significativamente mayor a la obtenida haciendo uso de un anticuerpo secundario anti-ratón inespecífico de alotipo. Por otra parte, un anticuerpo específico de alotipo es una herramienta muy útil para ensayos multiplex, por lo que resulta interesante comprobar su funcionalidad.

3. 7. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Se tomaron imágenes de los ensayos de inmunofluorescencia con el microscopio ApoTome.2 y con la cámara AxioCam MR (ambos de ZEISS, Oberkochen, Alemania) a aumentos de 10x, 20x y 63x. Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (NIH y LOCI, University of Wisconsin, EEUU) para ajustar el contraste y brillo de estas. Posteriormente, se montaron en paneles utilizando el software Inkscape.

4. RESULTADOS

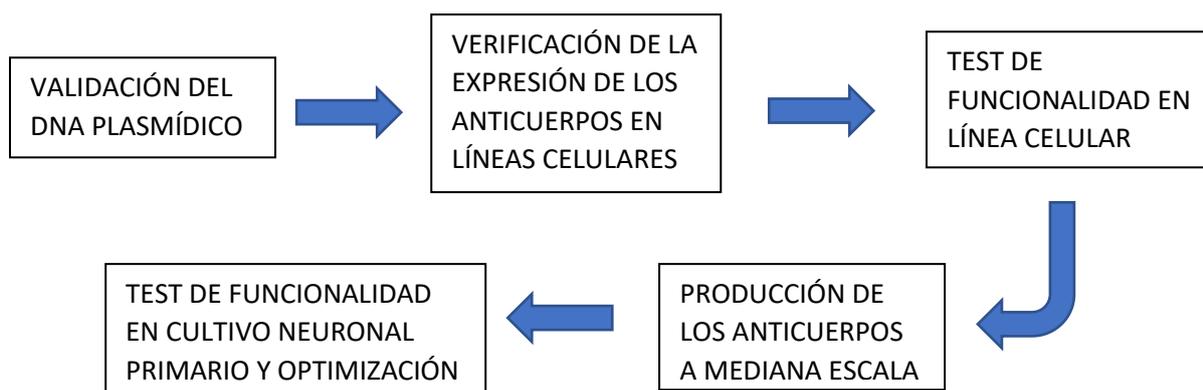


Figura 5. Esquema del procedimiento experimental. Fases de la expresión y validación de los anticuerpos recombinantes.

4. 1. VALIDACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO

Los cinco plásmidos que codifican para los anticuerpos se adquirieron a través de Addgene®, a donde fueron donados en primera instancia por James Trimmer (ANDREWS *et al.*, 2019). Se hizo una extracción del DNA plasmídico a pequeña escala de cada uno de los cinco plásmidos, tras crecer las bacterias transformadas adquiridas en las condiciones apropiadas. Posteriormente, se llevó a cabo una digestión enzimática y un análisis en gel de agarosa con el fin de comprobar la integridad de los elementos del plásmido de expresión (Figuras 6 y 7). Se hizo un análisis *in silico* con el fin de seleccionar los enzimas de restricción adecuados, así como para determinar el peso molecular de los fragmentos resultantes. Se utilizó la herramienta NEBcutter V2.0 de New England Biolabs®. En concreto, se buscaron enzimas que cortaran dos veces en la secuencia de DNA plasmídico, y, a ser posible, uno de ellos dentro de los marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés *open reading frames*), ya que son las regiones codificantes de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos (Figuras suplementarias 2 a 6, en el anexo). Después, se calculó el tamaño teórico de los fragmentos resultantes de la doble escisión de cada plásmido (Tabla 7).

Tabla 7. Tamaño teórico de los fragmentos resultantes de la digestión enzimática. Tamaño teórico en pares de bases (bp) de los fragmentos resultantes de la doble escisión. También se indica el/los enzima(s) de restricción utilizado(s) para digerir cada plásmido y en la columna ‘sitio de corte (bp)’ se indica entre paréntesis si este se encuentra en algún ORF.

Plásmido	Enzima(s)	Sitio de corte (bp)	Fragmentos (bp)
1 (anti-GluR1)	BamHI	4224 (ORF2), 5109	885, 8524
	BglII	347, 5239	4892, 4517
2 (anti-GFP)	EcoRV	3519 (ORF2), 5562	2043, 7348
	BglII	91, 4965	4874, 4517
3 (anti-PSD-95)	BglII	86, 4963	4877, 4517
4 (anti-Ank-G)	BamHI	4074 (ORF2), 4959	885, 8488
	BglII	233, 5089	4856, 4517
5 (anti-VGluT1)	BamHI	3986 (ORF2), 4871	885, 8515
	BglII	118, 5001	4883, 4517

Es importante tener en cuenta que hay varias causas potenciales de fallo enzimático: las preparaciones de DNA pueden contener inhibidores, los tampones utilizados pueden no ser óptimos para los enzimas (a pesar de las garantías del proveedor) y los enzimas pueden quedar inactivos con el paso del tiempo (ANAND *et al.*, 2004).

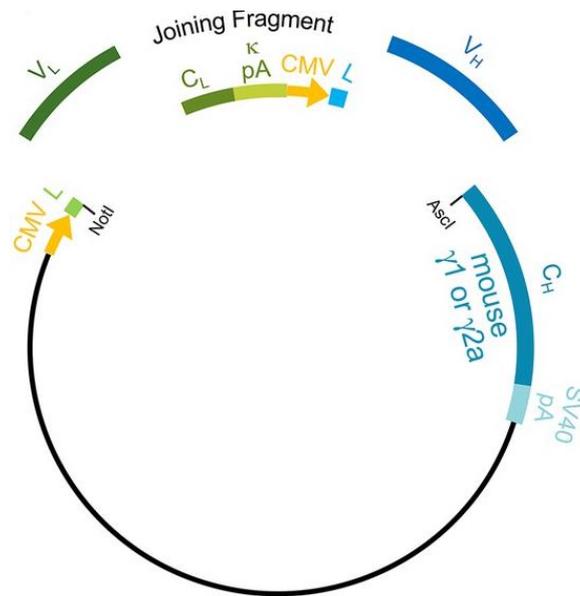


Figura 6. Esquema de los elementos del plásmido de expresión de los R-mAbs. La expresión del inserto (cadenas ligeras (verdes) y pesadas (azules)), está dirigida por dos promotores CMV (amarillo). Los productos de PCR de los dominios variables de las ambas cadenas (VL y VH) de los hibridomas de interés se fusionan con un fragmento de unión que comprende un dominio constante de cadena ligera κ (CL) y las secuencias de la cola poliA de la cadena ligera κ (κ pA), un promotor CMV para la expresión de cadena pesada y una secuencia líder (L) para la translocación de la cadena pesada a través de la membrana del retículo endoplasmático. Tras la fusión mediada por PCR de estos tres elementos, se lleva a cabo su inserción en el plásmido p1316; que contiene un promotor CMV *upstream* (en dirección 5') para la expresión de la cadena ligera, y una secuencia líder (L) para la translocación de dicha cadena a través de la membrana del retículo endoplasmático. En dirección 3' respecto al inserto hay un dominio constante de cadena pesada (CH), que es $\gamma 1$ o $\gamma 2a$ dependiendo del plásmido, seguido de la cola poliA SV40 (SV40 pA) (ANDREWS *et al.*, 2019).

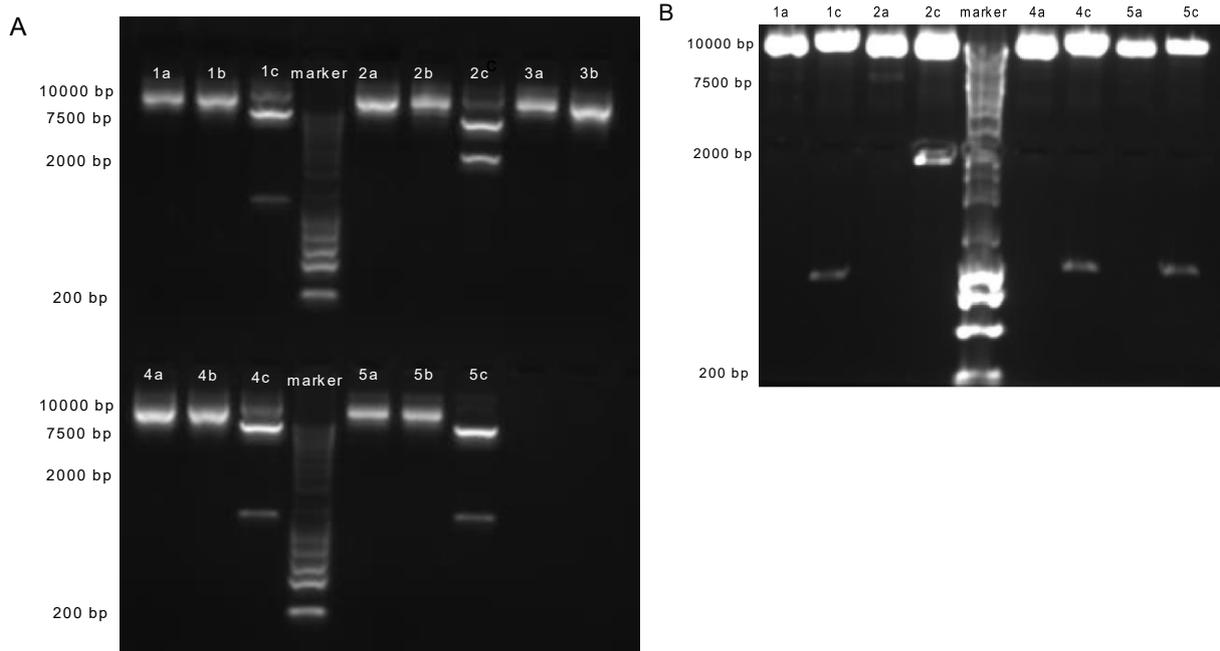


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa. A) 1a, 2a, 3a, 4a, 5a: plásmidos 1 a 5 sin digerir, se observan bandas a aproximadamente 10000 bp, que corresponden con la forma superenrollada del plásmido íntegro; 1b, 2b, 3b, 4b, 5b: plásmidos 1 a 5 tratados con el enzima BglIII, se observan bandas coincidentes con las de los plásmidos sin digerir; 1c, 4c, 5c: plásmidos 1, 4 y 5 tratados con BamHI, en los tres casos hay bandas a aproximadamente 8500 bp y 900 bp; 2c: plásmido 2 digerido con EcoRV, se pueden ver bandas a aproximadamente 5500 bp y 3500 bp. B) 1a, 2a, 4a, 5a: plásmidos sin digerir; 1c, 4c, 5c: plásmidos digeridos con BamHI; 2c: plásmido digerido con EcoRV. Se observan los mismos resultados que en A) en todos los casos. bp: pares de bases. 1: anti-GluR1; 2: anti-GFP; 3: anti-PSD-95; 4: anti-Ank-G; 5: anti-VGluT1.

Los resultados de la electroforesis (Figura 7A) revelaron que los plásmidos 1 (anti-GluR1), 2 (anti-GFP), 4 (anti-Ank-G) y 5 (anti-VGluT1) se encontraban íntegros, ya que al ser digeridos con los enzimas EcoRV (en el caso del plásmido anti-GFP) y BamHI (en el caso de los tres restantes) los fragmentos resultantes fueron del tamaño esperado. Por otro lado, se llegó a la conclusión de que el enzima BglII utilizado se encontraba inactivo, probablemente debido a su antigüedad. Esto hizo imposible testar la integridad del plásmido 3 (anti-PSD-95) porque BglII era el único enzima compatible con él. Se hizo una segunda electroforesis (Figura 7B) para corroborar los resultados obtenidos, donde no se incluyó el plásmido codificante para el anticuerpo anti-PSD-95 ni se utilizó el enzima BglII, ya que no sería informativo. Los resultados de esta segunda electroforesis coincidieron con los de la primera (Figura 7).

4. 2. VERIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTICUERPOS EN LÍNEAS CELULARES

Tras extraer el DNA plasmídico y comprobar su integridad, se comprueba la expresión de las proteínas recombinantes. Los cinco plásmidos extraídos son vectores de expresión de mamíferos, por lo que se deben transfectar células de mamífero para producir los anticuerpos de interés. Una de las líneas celulares de mamífero para la expresión de proteínas más comúnmente utilizada es HEK 293 (fibroblastos de riñón embrionario humano) (KHAN, 2013; JAZAYERI *et al.*, 2018; HUNTER *et al.*, 2018). Esta línea celular se puede transfectar usando polietilenamina (PEI) en vez de métodos virales, presentando un nivel alto de transfección mediada por PEI, con un rendimiento del 50 al 80% (HUH *et al.*, 2007; LONGO *et al.*, 2013). Por otro lado, en ANDREWS *et al.* (2019), se transfectaron células COS-1 (derivadas de fibroblastos renales de mono africano verde) para expresar distintos R-mAbs. En el presente proyecto se utilizaron las líneas celulares HEK 293T y COS-7, atendiendo a sus características y su disponibilidad. Las células HEK 293T son una línea variante de la HEK 293 que expresa el antígeno T SV40 grande, una oncoproteína derivada del papovirus SV-40; y que, al igual que las HEK 293 se transfectan de manera muy eficiente con DNA plasmídico (LIN *et al.*, 2014; CERVERA Y KAMEN, 2018). En cuanto a las células COS, también presentan el antígeno T SV40 grande (TRILL *et al.*, 1995), y las células COS-7 son el subtipo más utilizado junto a las COS-1 para expresar proteínas recombinantes (ARUFFO, 2002; ROMANO *et al.*, 2009; SAKURAI *et al.*, 2017). Se llevó a cabo la transfección de dos placas de seis pocillos de cada línea celular utilizando PEI. Uno de los pocillos de cada placa se transfectó con el plásmido CMV-GFP-IRES-CRE, que codifica para la expresión de GFP (KASPAR *et al.*, 2002). De esta manera, estas células sirven como control positivo para verificar *in vivo* (mediante observación de fluorescencia) que la transfección se ha realizado correctamente; y como control negativo para verificar que los anticuerpos de interés no se sintetizan intrínsecamente por las condiciones del experimento, si no, por la transfección específica de los respectivos plásmidos. En cada uno de los restantes cinco pocillos de cada placa se transfectó a las células con un plásmido diferente, cada uno codificante para uno de los anticuerpos recombinantes.

Los resultados sugieren que la transfección se llevó a cabo con éxito y las células HEK 293T presentaron una mayor eficiencia en la transfección que las COS-7 en lo que respecta al plásmido control (Figura 8), como era de esperar (HUH *et al.*, 2007; LONGO *et al.*, 2013). Entorno al 60% de las células HEK 293T se transfectaron con GFP, mientras que en el caso de las COS-7 solo lo hicieron aproximadamente el 10%. En teoría, en el resto de pocillos de la placa se habrá sintetizado y secretado al medio celular el anticuerpo correspondiente al plásmido transfectado. Para comprobar que las células expresan dichos anticuerpos se llevó a cabo un Western blot (WB) con el sobrenadante de los diferentes pocillos, recogido pasadas 48 y 72 horas de la transfección

(se juntaron ambos sobrenadantes) (Figura suplementaria 7 del anexo). Posteriormente se realizó un segundo WB utilizando una mayor cantidad de sobrenadante celular para corroborar los resultados obtenidos (Figura 9).

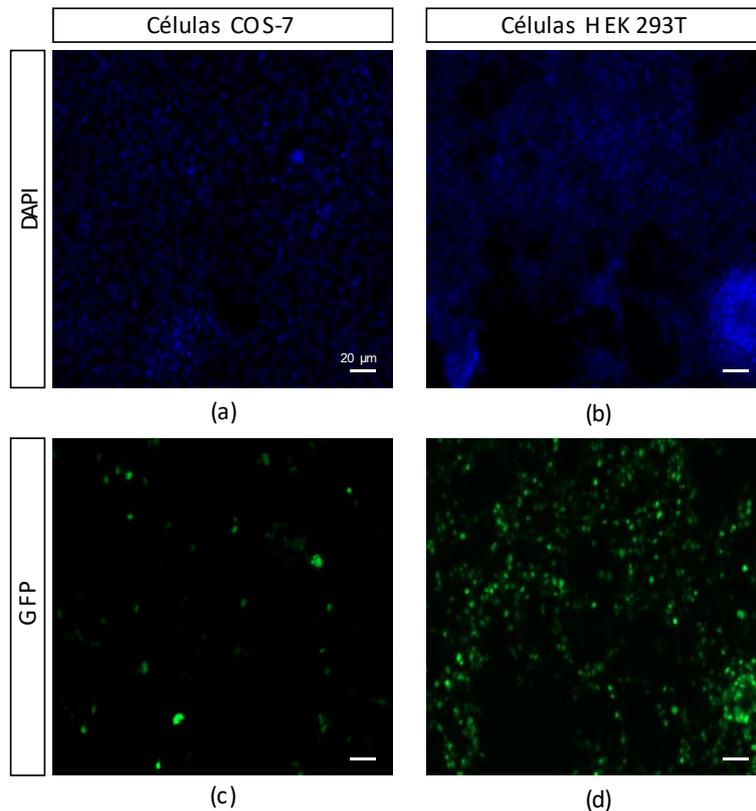


Figura 8. Control de la transfección mediante análisis de fluorescencia. Observación mediante microscopía de fluorescencia de las células control. (a) Núcleos de las células COS-7 marcados con DAPI. (b) Núcleos de las células HEK 293T marcados con DAPI. (c) Células COS-7 expresando la proteína GFP *in vivo* aproximadamente 48 horas después de la transfección. (d) Células HEK 293T expresando la proteína GFP *in vivo* aproximadamente 48 horas después de la transfección. Se puede observar que las células HEK 293T se transfectan en mayor proporción. El DAPI se utilizó a dilución 1:2000. Barra de escala: 20 μm.

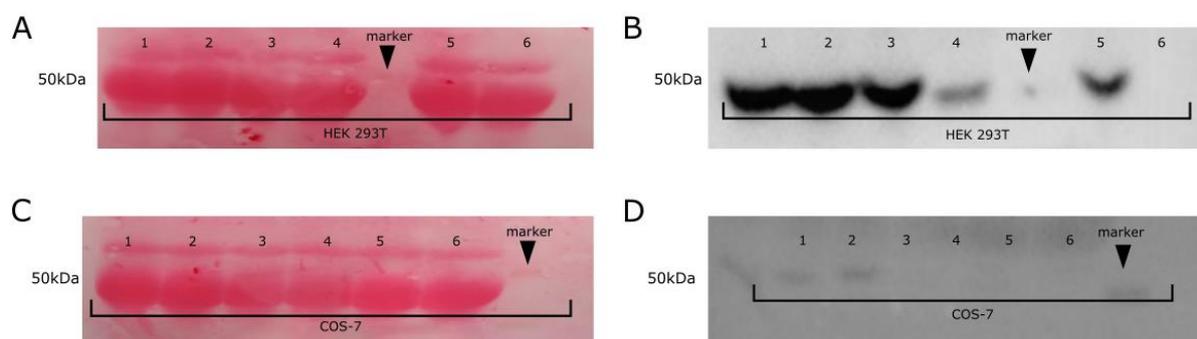


Figura 9. Análisis mediante Western blot de la expresión de los anticuerpos recombinantes en las líneas celulares HEK 293T y COS-7. Tras realizar una SDS-PAGE con los distintos sobrenadantes se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. A) y C) Tinción inespecífica con rojo Ponceau S de la membrana que contiene las proteínas del sobrenadante de ambas líneas celulares: de HEK 293T en A) y de COS-7 en C). Se puede observar la totalidad de proteínas transferidas electroforéticamente. B) Membrana de PVDF que contiene las proteínas del sobrenadante de las células HEK 293T después de la incubación con anticuerpo anti-ratón. D) Membrana de PVDF que contiene las proteínas del sobrenadante de las células COS-7 después de la incubación con anticuerpo anti-ratón. 1: anti-GluR1; 2: anti-GFP; 3: anti-PSD-95; 4: anti-Ank-G; 5: anti-VGLUT1, 6: GFP. El anticuerpo anti-ratón marcado con HRP se utilizó en ambos casos a dilución 1:2000. Se observan bandas a aproximadamente 50 kDa, que corresponde al peso molecular de una cadena pesada de un anticuerpo.

La tinción con Ponceau S (Figura 9A, C) confirmó que la electroforesis y la posterior transferencia gel-membrana se dio correctamente. Los resultados del WB indicaron que las células HEK 293T son mejores productoras de los anticuerpos recombinantes que las células COS-7 (Figura 9). Por otro lado, los anticuerpos que mejor se expresan son el anticuerpo anti-GluR1, el anti-GFP y el anti-PSD-95 (Figura 9B, D). Destacan especialmente el anti-GluR1 y el anti-GFP, siendo este último el que mejor se expresa de los cinco, ya que observamos una señal perceptible incluso en el sobrenadante de las células COS-7 (Figura 9D). También podemos observar una leve banda correspondiente al anticuerpo anti-GluR1 en el sobrenadante de las COS-7; sin embargo, no se pudo obtener una cantidad detectable del resto de anticuerpos en dicha línea celular. Por el contrario, en el sobrenadante de las células HEK 293T se pudieron detectar los cinco anticuerpos.

El control negativo (proteína GFP) sirvió para constatar que los anticuerpos se sintetizaron por la transfección específica de los respectivos plásmidos codificantes (Figura 9B, D), ya que en el pocillo correspondiente no se detectaron anticuerpos. Una vez verificada la expresión de los anticuerpos en las líneas celulares, se procedió a testar su funcionamiento, primero en líneas celulares y después en cultivo neuronal primario. Dado que las HEK 293T expresan mejor las proteínas, estas células se utilizarán para producir los anticuerpos a una escala mayor; y se utilizarán los anticuerpos producidos a pequeña escala (Figura 9) en estas células para el test de funcionalidad en línea celular. Las células COS-7, como se transfectan en menor proporción, son más útiles que las HEK 293T para validar su eficacia mediante inmunocitoquímica, ya que hay menos ruido de fondo y se puede visualizar mejor la colocalización o no colocalización de las señales de fluorescencia, además de comprobar que no existen señales inespecíficas en otras células no transfectadas.

4. 3. TEST DE FUNCIONALIDAD EN LÍNEA CELULAR

Primeramente, se probó el anticuerpo anti-GFP. Para ello, se transfectaron (utilizando PEI) células COS-7 con el plásmido CMV-GFP-IRES-CRE (KASPAR *et al.*, 2002), con el fin de sobreexpresar GFP, la proteína objetivo, en estas células. A continuación, se procedió a realizar un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-GFP como anticuerpo primario de manera directa (a dilución 1:1) y diluido en proporción 1:5 en solución de bloqueo. Se usaron dos anticuerpos secundarios anti-ratón distintos: un anticuerpo que reconoce todos los subtipos de las IgGs de ratón y otro que reconoce específicamente el alotipo IgG2a (al cual pertenecen anti-GFP y anti-PSD-95) (Figura 10). Los resultados del ensayo inmunocitoquímico mostraron que las células se transfectaron correctamente con la proteína objetivo (Figura 10(c), (d)), con una proporción de transfección que se corresponde con lo esperado (un 10% aproximadamente). Por otro lado, se puede observar que el anticuerpo anti-GFP reconoció específicamente la GFP transfectada (Figura 10(e) - (h)), al colocalizarse la señal del anticuerpo con la de la GFP.

En lo que respecta a la dilución del anticuerpo primario, vemos que funciona adecuadamente tanto a dilución 1:1 como a 1:5, lo que permite aumentar el rendimiento del anticuerpo que se produzca, dado que la sensibilidad y la especificidad del anticuerpo son iguales a ambas diluciones. En cuanto al anticuerpo secundario específico contra el alotipo IgG2a; los resultados muestran que el patrón de las señales obtenidas utilizando dicho anticuerpo coinciden con las del anticuerpo secundario que reconoce cualquier IgG de ratón, siendo capaz de detectar la proteína recombinante. Cabe mencionar que la señal obtenida al utilizar el anticuerpo secundario específico para IgG2a tiene una intensidad ligeramente mayor que el inespecífico.

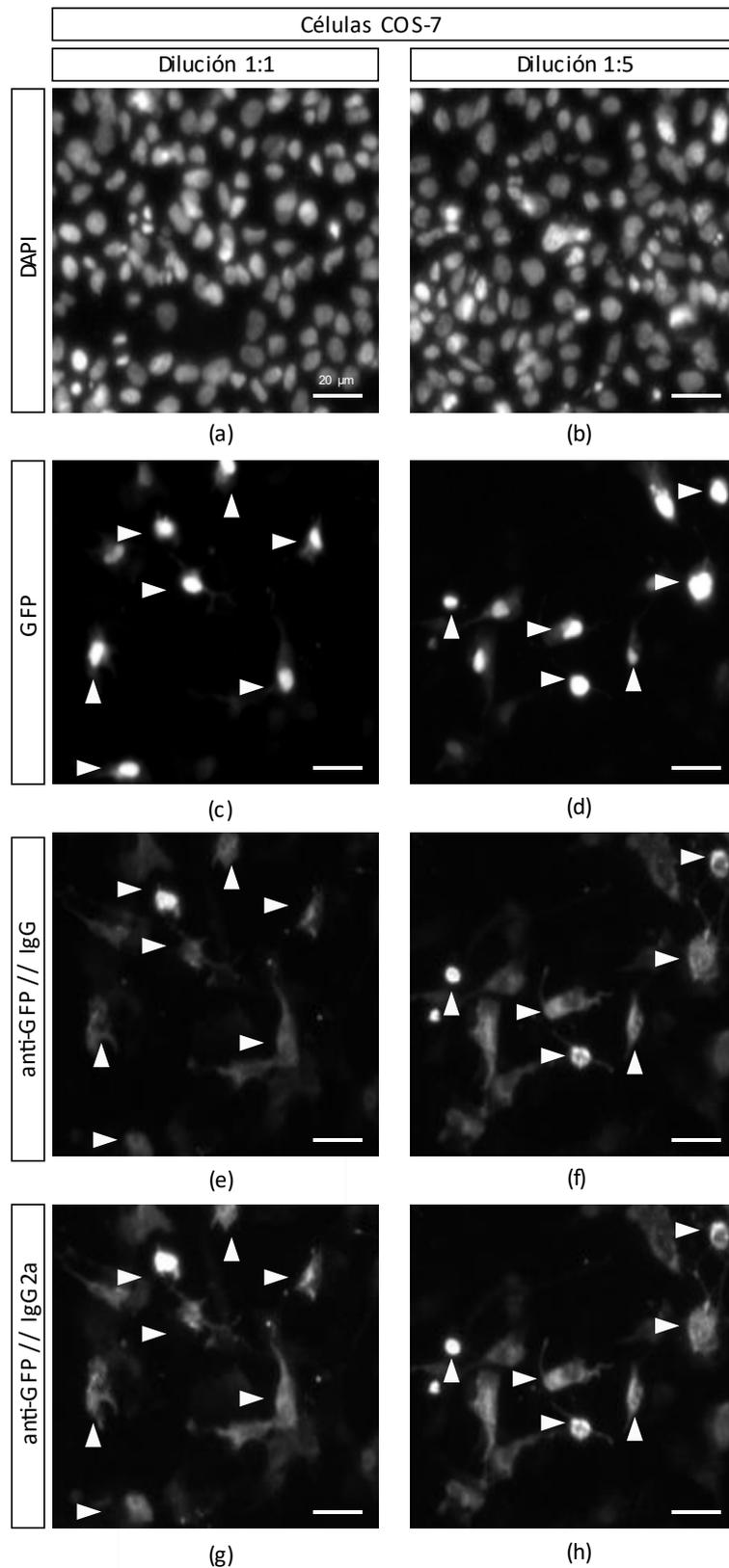


Figura 10. Validación del anticuerpo anti-GFP en la línea celular COS-7. (a-b) Núcleos celulares marcados con DAPI. (c-d) Expresión de la proteína GFP en las células transfectadas. (e) Detección de GFP mediante anticuerpo anti-GFP a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón. (f) Anticuerpo anti-GFP a dilución 1:5 y anticuerpo secundario anti-ratón. (g) Anticuerpo anti-GFP a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón específico contra IgG2a. (h) Anticuerpo anti-GFP a dilución 1:5 y anticuerpo secundario anti-ratón específico contra IgG2a. Ambos anticuerpos secundarios se utilizaron a dilución 1:500. Barra de escala: 20 μ m.

A continuación, se validó el anticuerpo anti-PSD-95 en línea celular. Se transfectaron células COS-7 con la proteína objetivo PSD-95, utilizando el plásmido PSD-95-pTagRFP (adquirido a través de Addgene®). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti-PSD-95 producido y con un anticuerpo secundario anti-ratón (Figura 11). En este caso, y de aquí en adelante, se utilizará únicamente anticuerpo secundario anti-ratón inespecífico (contra IgG de ratón) por cuestiones de disponibilidad. Los resultados ponen de manifiesto que la transfección de la proteína objetivo PSD-95 se llevó a cabo con éxito (Figura 11(b)), así como que el anticuerpo recombinante es capaz de reconocer satisfactoriamente dicha proteína (Figura 11(c)).

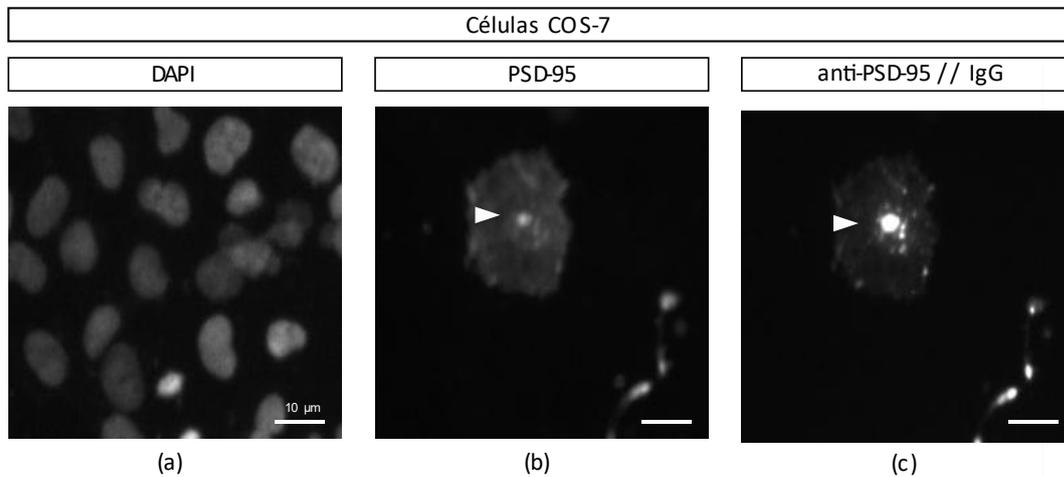


Figura 11. Validación del anticuerpo anti-PSD-95 en la línea celular COS-7. (a) Núcleos celulares marcados con DAPI. (b) Expresión de la proteína PSD-95 en las células transfectadas. (c) Detección de PSD-95 mediante anticuerpo anti-PSD-95 a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón a dilución 1:500. Barra de escala: 10 μ m.

Posteriormente, se probó el funcionamiento en línea celular del anticuerpo anti-VGluT1, siguiendo exactamente el mismo procedimiento que se ha descrito arriba para el anticuerpo anti-PSD-95, pero cambiando la proteína objetivo (y utilizando el anticuerpo anti-VGluT1 recombinante). En este caso, las células COS-7 se transfectaron con el plásmido pCAG vGluT1 mCherry (KWON *et al.*, 2016) (también adquirido a través de Addgene®). El ensayo inmunocitoquímico revela que la transfección se dio correctamente (Figura 12(b)) y que el anticuerpo anti-VGluT1 reconoce la proteína objetivo con suficiente especificidad y sensibilidad (Figura 12(c)), al colocarse las señales correspondientes a VGluT1 y anti-VGluT1.

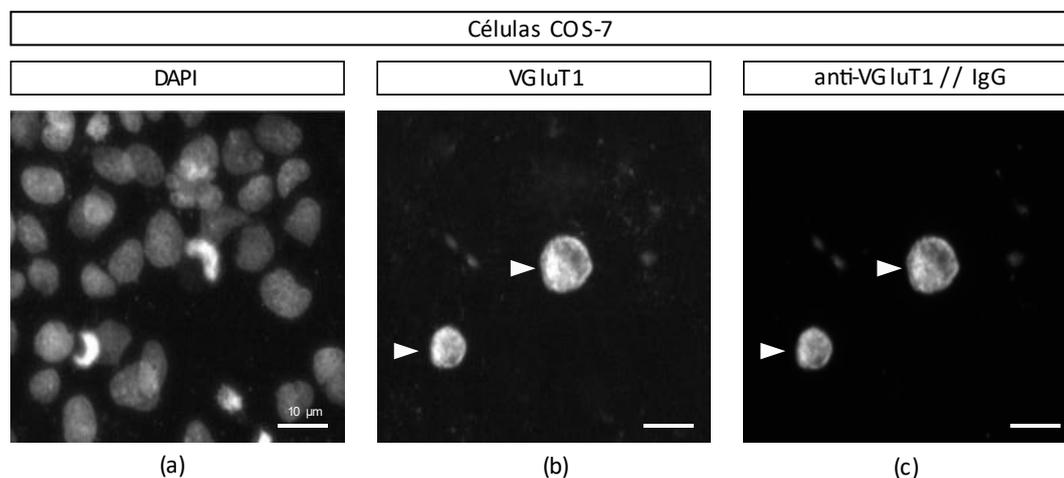


Figura 12. Validación del anticuerpo anti-VGluT1 en la línea celular COS-7. (a) Núcleos celulares marcados con DAPI. (b) Expresión de la proteína VGluT1 en las células transfectadas. (c) Detección de VGluT1 mediante anticuerpo anti-VGluT1 a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón a dilución 1:500. Barra de escala: 10 μ m.

4. 4. PRODUCCIÓN DE LOS ANTICUERPOS RECOMBINANTES A MEDIANA ESCALA

Tras comprobar que los anticuerpos recombinantes producidos anti-GFP, anti-PSD-95 y anti-VGluT1 funcionan adecuadamente en la línea celular COS-7, se pueden producir a mayor escala y ser testados en cultivo neuronal primario. No obstante, no se dispone de plásmidos que provoquen la expresión de las proteínas objetivo GluR1 y Ank-G, por lo que los anticuerpos anti-GluR1 y anti-Ank-G se probaron directamente en neuronas. Dado que el anticuerpo anti-GFP fue el primero en validarse en células COS-7, también fue el primero que se produjo a mediana escala. Para ello, se realizó una maxiprep en lugar de una miniprep, con el fin de extraer una mayor cantidad de DNA plasmídico, y se transfectaron ocho frascos de 75 cm² sembrados con células HEK 293T. El sobrenadante de estas células se recogió a las 48 y a las 72 horas de la transfección. Ambos sobrenadantes se mezclaron y se consiguió un total de 80 mL de sobrenadante con anticuerpo anti-GFP. El resto de los anticuerpos no se pudieron producir a mediana escala debido al excepcional Estado de alarma, establecido por la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19 (Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo).

4. 5. TEST DE FUNCIONALIDAD EN CULTIVO NEURONAL PRIMARIO

En aras de comprobar la funcionalidad del anticuerpo anti-GFP en neuronas, se transfectó cultivo neuronal primario con el plásmido CMV-GFP-IRES-CRE (KASPAR *et al.*, 2002) mediante electroporación. Posteriormente se utilizó el anticuerpo anti-GFP producido tanto a pequeña como a mediana escala para su detección y ambos arrojaron los mismos resultados. Concluimos, pues, que el anticuerpo anti-GFP recombinante producido a mediana escala es capaz de detectar con éxito la proteína GFP en neuronas. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos utilizando anti-GFP producido a mediana escala en células HEK 293T como anticuerpo primario.

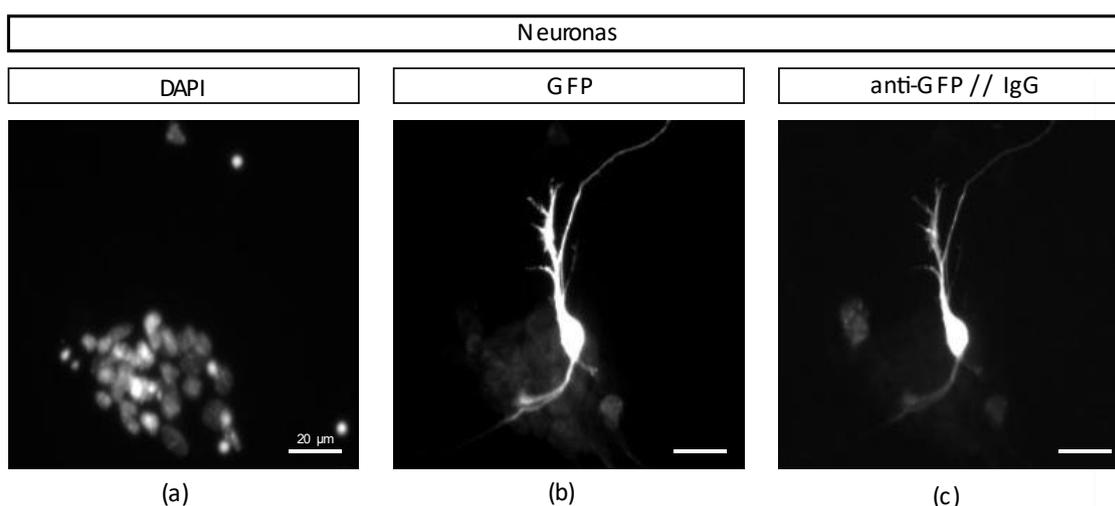


Figura 13. Validación del anticuerpo anti-GFP en cultivo neuronal primario. (a) Núcleos celulares marcados con DAPI. (b) Neurona transfectada expresando GFP. (c) Detección de GFP mediante anticuerpo anti-GFP a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón a dilución 1:500. Barra de escala: 20 µm.

Previamente se estableció que el anticuerpo anti-GFP funcionaba adecuadamente a una dilución 1:5 en línea celular (Figura 10(f), (h)). Para comprobar cuánto se puede optimizar la producción de este anticuerpo al usarse en neuronas, se prepararon tres diluciones distintas de este: 1:2, 1:10 y 1:50. Se utilizó el anticuerpo recombinante producido a mediana escala en células HEK 293T.

Los resultados del ensayo inmunocitoquímico realizado (Figura 14) indicaron que las neuronas se transfectaron correctamente con la proteína objetivo GFP (Figura 14(d) - (f)) y que el anticuerpo recombinante anti-GFP producido detecta dicha proteína prácticamente con la misma eficiencia al utilizarlo de forma directa (Figura 13(c)) que a las diferentes diluciones testadas (Figura 14(g) - (i)), ya que la intensidad de las señales obtenidas es muy similar.

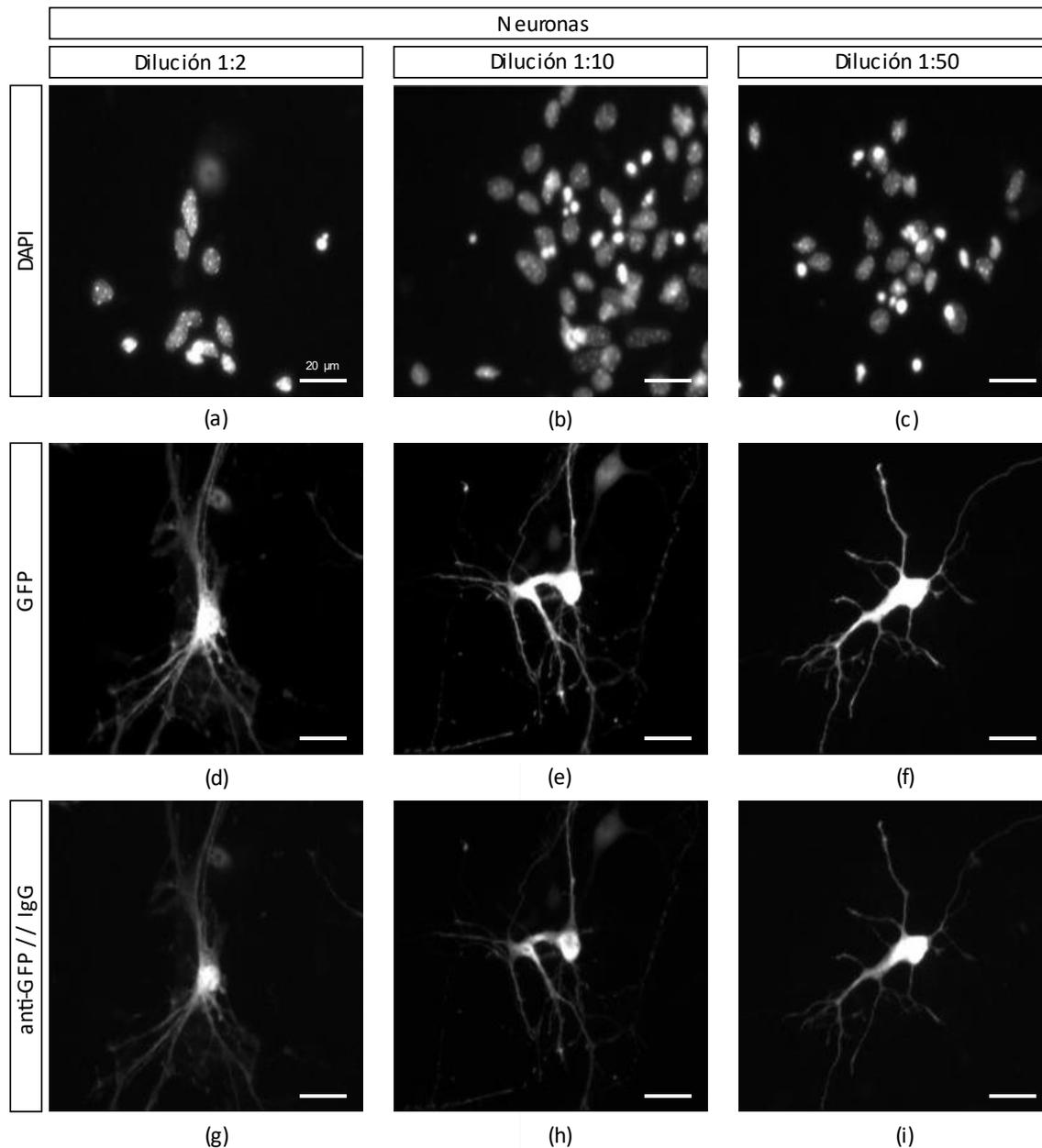


Figura 14. Optimización de la dilución del anticuerpo anti-GFP en cultivo neuronal primario. (a-c) Núcleos celulares marcados con DAPI. (d-f) Neuronas transfectadas mediante electroporación expresando GFP. (g-i) Detección de GFP mediante anticuerpo anti-GFP a diferentes diluciones y anticuerpo secundario anti-ratón a dilución 1:500: (g) Anticuerpo anti-GFP a dilución 1:2. (h) Anticuerpo anti-GFP a dilución 1:10. (i) Anticuerpo anti-GFP a dilución 1:50. Barra de escala: 20 µm.

Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos anti-GluR1 y anti-Ank-G no se pudieron probar en la línea celular COS-7 porque no se dispone de plásmidos que las codifiquen y estas células no expresan naturalmente estas dos proteínas objetivo. Así pues, se hace necesario testarlas directamente en cultivo neuronal primario.

En lo que respecta al anticuerpo anti-GluR1, se sabe que este receptor iónotropico de glutamato, que es uno de los principales receptores de neurotransmisores del sistema nervioso central, se expresa tanto en la superficie del soma neuronal (en la membrana plasmática) como en todo el árbol dendrítico, aunque la expresión en el soma es mayor (RICHMOND *et al.*, 1996).

En este ensayo, se observó fluorescencia en las dendritas y en los somas neuronales (Figura 15(c), (d)), presentando los somas una mayor intensidad de señal (Figura 15(d)). Si consultamos la literatura científica disponible, vemos que estos resultados coinciden con los obtenidos en otros ensayos inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos para la localización de GluR1 (PICKARD *et al.*, 2000; BAUDE *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2007; AL RAHIM Y HOSSAIN, 2013). En definitiva, y de acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que el anticuerpo recombinante anti-GluR1 reconoce este receptor de glutamato con sensibilidad y especificidad apropiadas y es apto para ser usado en el ámbito de la neurobiología.

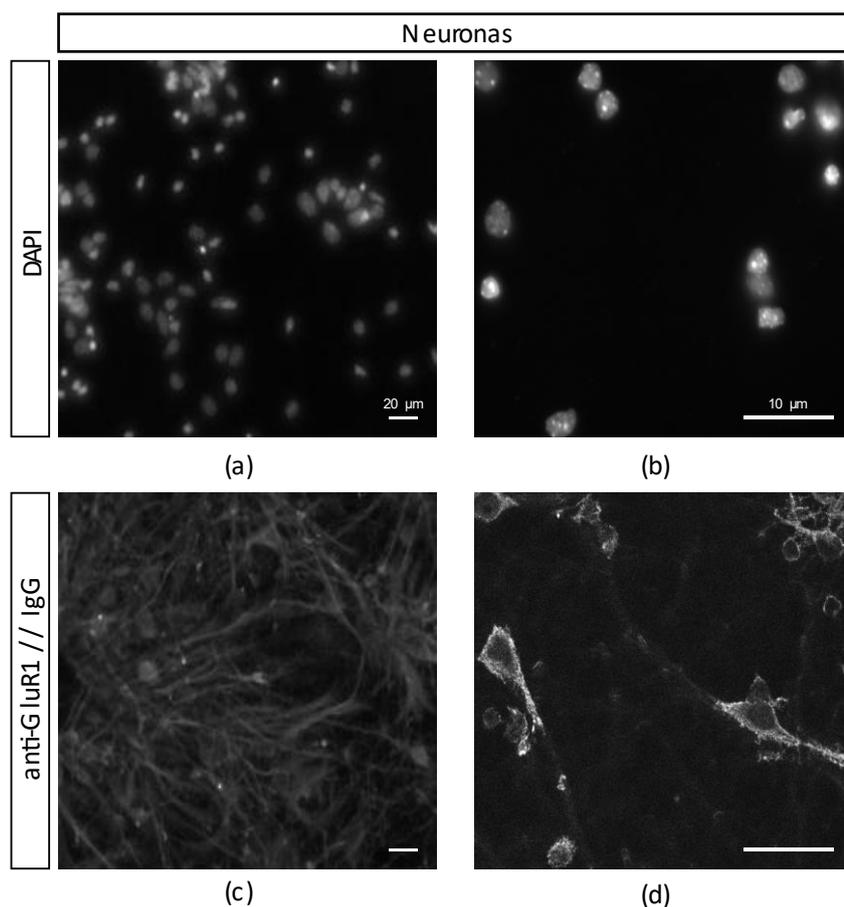


Figura 15. Validación del anticuerpo anti-GluR1 en cultivo neuronal primario. (a, b) Núcleos celulares marcados con DAPI. (c, d) Detección de GluR1 mediante anticuerpo anti-GluR1 a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón a dilución 1:500. (a, c) Barra de escala: 20 μm. (b, d) Barra de escala: 10 μm.

Por último, se comprobó la funcionalidad del anticuerpo recombinante anti-Ank-G (Figura 16). La proteína Ank-G regula la sinapsis GABAérgica en el segmento inicial del axón, expresándose por tanto en dicha estructura entre los dominios somatodendrítico y axonal, y jugando un papel clave en su desarrollo y maduración (HEDSTROM *et al.*, 2007; FREAL *et al.*, 2016; JONES *et al.*, 2016; NELSON *et al.*, 2018; SCHLÜTER *et al.*, 2019).

Como se puede observar, la señal obtenida en el ensayo inmunocitoquímico se localiza en el segmento inicial del axón (Figura 16(c), (d)); por ello, se concluyó que el anticuerpo anti-Ank-G funciona adecuadamente, reconociendo la proteína Ank-G en cultivo neuronal primario.

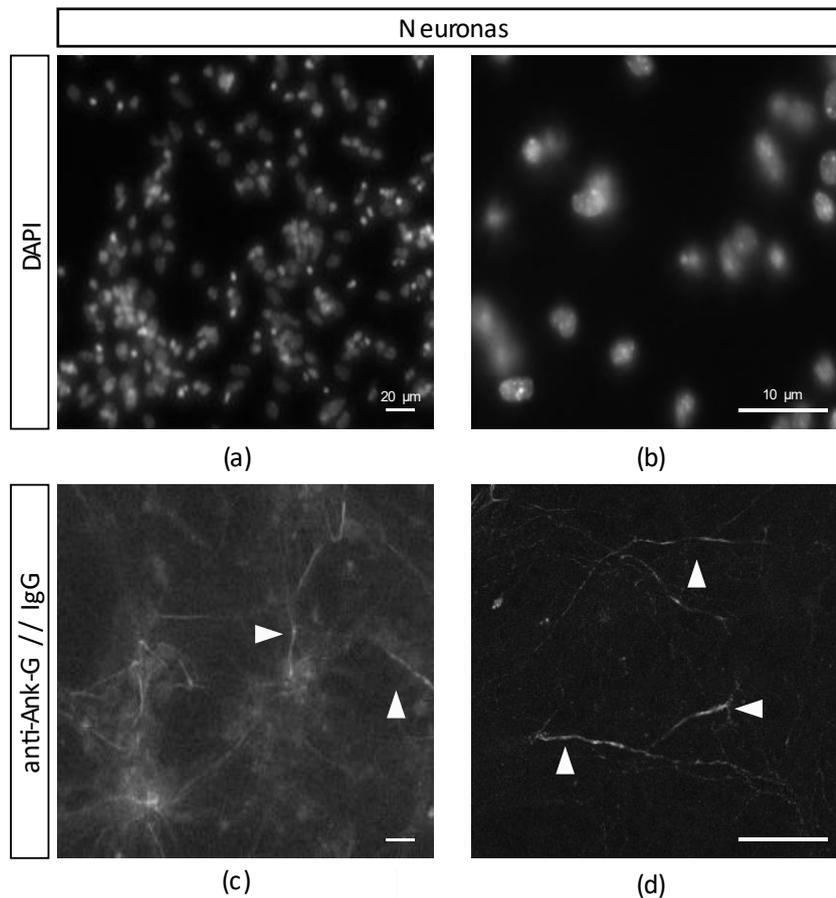


Figura 16. Validación del anticuerpo anti-Ank-G en cultivo neuronal primario. (a, b) Núcleos celulares marcados con DAPI. (c, d) Detección de Ank-G mediante anticuerpo anti-Ank-G a dilución 1:1 y anticuerpo secundario anti-ratón a dilución 1:500. (a, c) Barra de escala: 20 µm. (b, d) Barra de escala: 10 µm. (c, d) Se destacan con puntas de flecha algunos de los segmentos iniciales del axón.

Es necesario puntualizar que los anticuerpos anti-PSD-95 y anti-VGluT1 no se pudieron testar en cultivo neuronal primario debido a la instauración del Estado de alarma, derivada de la crisis sanitaria provocada por el COVID-19 (Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo). Por el mismo motivo, también queda pendiente optimizar la dilución a la que se pueden utilizar los anticuerpos anti-GluR1, anti-PSD-95, anti-Ank-G y anti-VGluT1.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que todos los anticuerpos monoclonales recombinantes producidos reconocen las proteínas objetivo con suficiente sensibilidad y especificidad. En el caso de los anticuerpos anti-GFP y anti-PSD-95 se comprobó que también podían ser detectados utilizando un anticuerpo secundario específico contra el alotipo IgG2a, lo que resulta interesante para experimentos de inmunomarcaje múltiple o multiplex. Es preciso señalar que dicho anticuerpo secundario se probó únicamente contra el anticuerpo anti-GFP, pero al ser idénticas las regiones constantes en los anticuerpos anti-GFP y anti-PSD-95, el resultado no debería variar. En el caso de los anticuerpos anti-GluR1, anti-Ank-G y anti-VGluT1; no se pudo testar un anticuerpo secundario específico contra el alotipo IgG1 porque no se disponía de este. El enfoque experimental fue adaptado de ANDREWS *et al.* (2019) y los resultados son coherentes con los presentados en dicho artículo. Por otro lado, el protocolo para la producción y validación de anticuerpos recombinantes se optimizó. En las etapas tempranas del procedimiento experimental, es interesante utilizar más de una línea celular porque, como se ha visto, mientras que las células HEK 293T presentan un ratio de transfección elevado que permite la producción de las proteínas recombinantes a mediana escala, las COS-7 facilitan su validación mediante inmunofluorescencia. Además, existe un enorme potencial de optimización en relación con el rendimiento de los anticuerpos, dado que el anticuerpo anti-GFP funciona incluso a una dilución 1:50. Se hace necesario, no obstante, remarcar que los anticuerpos anti-PSD-95 y anti-VGluT1 todavía han de ser probados en cultivo neuronal primario; se ha de optimizar la dilución para anti-GluR1, anti-PSD-95, anti-Ank-G y anti-VGluT1; y todos deben ser testados en tejido cerebral.

Las proteínas sinápticas tienen dos funciones principales: regulan la liberación de neurotransmisores y participan en el desarrollo temprano de las neuronas (KONONENKO *et al.*, 2013). Los anticuerpos producidos se pueden utilizar como marcadores de la sinapsis, siendo herramientas imprescindibles para caracterizar las alteraciones del comportamiento. En relación con estas alteraciones, una funcionalidad cerebral adecuada implica la correcta regulación del equilibrio entre la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria mediante la liberación neurotransmisores, y el desequilibrio entre dichos neurotransmisores constituye el origen común de los trastornos psiquiátricos (ARORA *et al.*, 2018). Concretamente, este trabajo se ha desarrollado en el marco de estudio de la esquizofrenia, un trastorno del neurodesarrollo que afecta al 1.1% de la población humana y cuyos síntomas aparecen en la adolescencia (COLEY Y WAO, 2018). La base neurobiológica de la esquizofrenia es la poda sináptica, es decir, la reducción del número de sinapsis neuronales (SAIZ *et al.*, 2010). En cuanto a la base genética, el gen de riesgo de la esquizofrenia (Neuregulina 1 o Nrg1) es responsable en gran medida del mecanismo patológico y regula la expresión de PSD-95, la proteína de andamiaje principal de la sinapsis excitatoria (PEDRIQUE Y FAZZARI, 2010). En la esquizofrenia, una PSD-95 deficiente y/o disfuncional desemboca en una disminución de la cantidad de espinas dendríticas, que son las protuberancias en la membrana del árbol dendrítico neuronal donde se produce la sinapsis (COLEY Y WAO, 2018). El resto de las proteínas sinápticas sobre las que versa este trabajo también influyen en la esquizofrenia, aunque los mecanismos moleculares mediante los cuales promueven la eliminación sináptica permanecen desconocidos en gran medida.

No obstante, la relevancia de estas proteínas para el presente proyecto reside en su capacidad de funcionar como biomarcadores para estudiar las sinaptopatías. Así pues, además de la esquizofrenia, también sirven para caracterizar otros trastornos del neurodesarrollo como la epilepsia, enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad

de Parkinson, y otros trastornos mentales como la depresión a largo plazo, la ansiedad patológica, el trastorno bipolar o la agresividad social (KANDEL *et al.*, 1997; KENDLER *et al.*, 2012; LUONI *et al.*, 2016; ARDILES *et al.*, 2017).

Por otro lado, en neurobiología resultan particularmente útiles los ensayos multiplex (de inmunomarcaje múltiple). En estos ensayos, se examinan diferentes moléculas objetivo en la misma muestra simultáneamente, en lugar de en varias muestras por separado. Esto resulta especialmente ventajoso para estudios realizados sobre tejidos que estén disponibles en cantidades limitadas, algo habitual en neurociencia, sobre todo si se trabaja con tejido humano. El enfoque tradicional se basa en utilizar anticuerpos primarios de diferentes especies y después detectarlos con anticuerpos secundarios específicos para las especies utilizadas, pero está muy limitado debido a la falta de anticuerpos disponibles de numerosas especies (ANDREWS *et al.*, 2019). De hecho, si consultamos The Antibody Registry (ANTIBODYREGISTRY.ORG, 2020), vemos que de los 2 478 859 anticuerpos registrados (a 28/06/2020), aproximadamente el 84% provienen de solo tres especies: conejo (45%), ratón (30%) y cabra (9%), representando todas las demás especies juntas el 16% restante. Por una parte, los anticuerpos de conejo (ya sean policlonales o monoclonales) no son ideales para los ensayos multiplex, ya que, a diferencia de la mayoría de los mamíferos, los conejos no producen IgG de subclases distintas sino solo una IgG genérica única (KNIGHT *et al.*, 1985; ANDREWS *et al.*, 2019). Por otra parte, los anticuerpos secundarios son mayoritariamente de cabra, y en este caso son todos policlonales, lo que reduce su especificidad. En cambio, la utilidad de los anticuerpos monoclonales de ratón en ensayos multiplex se ve potenciada por la existencia de las cuatro subclases o alotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (MANNING *et al.*, 2012). Asimismo, los anticuerpos secundarios anti-ratón son capaces de reconocer de manera específica y fiable los diferentes alotipos (ANDREWS *et al.*, 2019), de hecho, en este proyecto se ha comprobado la funcionalidad de un anticuerpo secundario contra las IgG2a de ratón recombinantes producidas. De este modo, la posibilidad que ofrecen los anticuerpos recombinantes de cambiar su alotipo, isotipo e incluso su especie fácilmente es una gran ventaja, ya que se pueden implementar nuevas combinaciones de anticuerpos, lo que a su vez nos lleva a poder identificar más proteínas en un mismo tejido, permitiendo así una mejor comprensión de la arquitectura molecular de este.

Por otra parte, es muy notable la diferencia del coste económico entre los anticuerpos monoclonales utilizados tradicionalmente para detectar las proteínas GluR1, GFP, PSD-95, Ank-G y VGluT1 y los plásmidos utilizados para producir los anticuerpos recombinantes en este proyecto. Mientras que el precio de los primeros ronda los 400€ por 100 μ L (Thermo Scientific™), los plásmidos codificantes para los anticuerpos recombinantes utilizados en este trabajo cuestan 67€ (Addgene®); y se pueden producir cantidades mucho mayores de anticuerpo, que además se pueden diluir y seguir siendo funcionales. De esta manera, es indudable que los anticuerpos recombinantes son mucho más rentables.

Finalmente, la comunidad científica es partidaria de sustituir los anticuerpos utilizados tradicionalmente por anticuerpos recombinantes, debido a las ventajas que estos últimos presentan respecto a los primeros en cuanto a afinidad, especificidad, reproducibilidad, velocidad de generación e inmunogenicidad; sin olvidar que es una tecnología que no precisa de animales, cumpliendo así con el principio de reemplazo. De hecho, ya se están definiendo estrategias para validar e introducir estos anticuerpos en el mercado y conseguir reemplazar totalmente a los anticuerpos producidos por animales (GROFF *et al.*, 2020).

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

1. Los anticuerpos monoclonales recombinantes anti-GluR1, anti-GFP, anti-PSD-95, anti-Ank-G y anti-VGluT1 pueden producirse utilizando líneas celulares.
2. La línea celular HEK 293T resulta óptima para la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes a mediana escala.
3. Los anticuerpos monoclonales recombinantes producidos son funcionales y reconocen las proteínas GFP, PSD-95 y VGluT1 cuando se sobreexpresan en líneas celulares o cultivo primario neuronal.
4. Los anticuerpos monoclonales recombinantes producidos son funcionales y reconocen las proteínas GluR1 y Ank-G en cultivo primario neuronal.

7. BIBLIOGRAFÍA

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. & SHIV, P. (2014). *Cellular and Molecular Immunology*. 8th Edition. Editorial Saunders. Philadelphia.

AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; HO, W. Y.; ALITHEEN, N. B. & HAMID, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 980250.

AL RAHIM, M. & HOSSAIN, M. A. (2013). Genetic deletion of NP1 prevents hypoxic-ischemic neuronal death via reducing AMPA receptor synaptic localization in hippocampal neurons. *Journal of the American Heart Association*, 2(1), e006098.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. (2002). The generation of antibody diversity. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. Editorial Garland Science. New York.

ANAND, R. D.; SERTIL, O. & LOWRY, C. V. (2004). Restriction digestion monitors facilitate plasmid construction and PCR cloning. *BioTechniques*, 36(6), 982–985.

ANDREWS, N. P.; BOECKMAN, J. X.; MANNING, C. F.; NGUYEN, J. T.; BECHTOLD, H.; DUMITRAS, C.; GONG, B.; NGUYEN, K.; VAN DER LIST, D.; MURRAY, K. D.; ENGBRECHT, J. & TRIMMER, J. S. (2019). A toolbox of IgG subclass-switched recombinant monoclonal antibodies for enhanced multiplex immunolabeling of brain. *eLife*, 8, e43322.

ARDILES, A. O.; GRABRUCKER, A. M.; SCHOLL, F. G.; RUDENKO, G. & BORSELLO, T. (2017). Molecular and Cellular Mechanisms of Synaptopathies. *Neural plasticity*, 2017, 2643943.

ARORA, V.; PECORARO, V.; ALLER, M.; ROMÁN, C.; PATERNAIN, A. & LERMA, J. (2018). Increased Grik4 gene dosage causes imbalanced circuit output and human disease-related behaviors. *Cell Reports*, 23(13), 3827-3838.

ARUFFO, A. (2002). Transient expression of proteins using COS cells. *Current Protocols in Molecular Biology*, 60, 16.12.1-16.12.7.

ASCOLI, C. A. & AGGELER, B. (2018). Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques*, 65(3), 127-136.

BACKHAUS, O. (2018). *Generation of Antibody Diversity. Antibody Engineering*. Editorial IntechOpen. Rijeka.

BASU, K.; GREEN, E. M.; CHENG, Y. & CRAIK, C. S. (2019). Why recombinant antibodies - benefits and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 60, 153-158.

BAUDE KIM, M. J.; FUTAI, K.; JO, J.; HAYASHI, Y.; CHO, K. & SHENG, M. (2007). Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron*, 56(3), 488-502.

BOURNAZOS, S.; WANG, T. T.; DAHAN, R.; MAAMARY, J. & RAVETCH, J. V. (2017). Signaling by antibodies: recent progress. *Annual review of immunology*, 35, 285–311.

BOYD, S. D.; GAËTA, B. A.; JACKSON, K. J.; FIRE, A. Z.; MARSHALL, E. L.; MERKER, J. D.; MANIAR, J. M.; ZHANG, L. N.; SAHAF, B.; JONES, C. D.; SIMEN, B. B.; HANCZARUK, B.; NGUYEN, K. D.; NADEAU, K. C.; EGHOLM, M.; MIKLOS, D. B.; ZEHNDER, J. L. & COLLINS, A. M. (2010). Individual variation in the germline Ig gene repertoire inferred from variable region gene rearrangements. *Journal of Immunology*, 184(12), 6986-6992.

BRADBURY, A.; VELAPPAN, N.; VERZILLO, V.; OVECKA, M.; CHASTEEN, L.; SBLATTERO, D.; MARZARI, R.; LOU, J.; SIEGEL, R. & PAVLIK, P. (2003). Antibodies in proteomics II: Screening, high-throughput characterization and downstream applications. *Trends in Biotechnology*, 21(7), 312-317.

BREEDVELD, F. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet*, 355(9205), 735-740.

CERVERA, L. & KAMEN, A. A. (2018). Large-scale transient transfection of suspension mammalian cells for VLP production. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1674, 117-127.

CHEN, H.; WANG, C.; GAO, Y.; GAO, J.; ZHOU, X.; CAI, Z. & SUN, Q. (2015). Generation of scFv specific to human VEGFR-3 from the neutralizing mAb BDD073. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 28(1), 19-22.

CHEN, X.; LIU, S.; GORAYA, M. U.; MAAROUF, M.; HUANG, S. & CHEN, J. L. (2018). Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Frontiers in immunology*, 9, 320.

COLEY, A. & GAO, W. (2018). PSD-95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 82, 187-194.

CROSNIER, C.; STAUDT, N. & WRIGHT, G. J. (2010). A rapid and scalable method for selecting recombinant mouse monoclonal antibodies. *BMC biology*, 8, 76.

DELIC, V.; CHANDRA, S.; ABDELMOTILIB, H.; MALTBIE, T.; WANG, S.; KEM, D.; SCOTT, H. J.; UNDERWOOD, R. N.; LIU, Z.; VOLPICELLI-DALEY, L. A. & WEST, A. B. (2018). Sensitivity and specificity of phospho-Ser129 α -synuclein monoclonal antibodies. *The Journal of comparative neurology*, 526(12), 1978-1990.

DENG, Y. P.; XIE, J. P.; WANG, H. B.; LEI, W. L.; CHEN, Q. & REINER, A. (2007). Differential localization of the GluR1 and GluR2 subunits of the AMPA-type glutamate receptor among striatal neuron types in rats. *Journal of chemical neuroanatomy*, 33(4), 167-192.

DONDELINGER, M.; FILÉE, P.; SAUVAGE, E.; QUINTING, B.; MUYLDERMANS, S.; GALLEN, M. & VANDEVENNE, M. S. (2018). Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigen-binding surface/residue definition. *Frontiers in immunology*, 9, 2278.

DUNBAR, J.; KRAWCZYK, K.; LEEM, J.; BAKER, T.; FUCHS, A.; GEORGES, G.; SHI, J. & DEANE, C. M. (2014). SAbDab: the structural antibody database. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D1140-D1146.

EASTWOOD, S. L. & HARRISON, P. J. (2005). Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophrenia research*, 73(2-3), 159-172.

EGLI, J.; SCHLOTHAUER, T.; SPICK, C.; SEEGER, S.; SINGER, T.; ODERMATT, A. & IGLESIAS, A. (2019). The binding of human IgG to minipig Fc γ Rs - implications for preclinical assessment of therapeutic antibodies. *Pharmaceutical research*, 36(3), 47.

FAZZARI, P.; SNELLINX, A.; SABANOV, V.; AHMED, T.; SERNEELS, L.; GARTNER, A.; SHARIATI, S. A.; BALSCHUN, D. & DE STROOPER, B. (2014). Cell autonomous regulation of hippocampal circuitry via Aph1b- γ -secretase/neuregulin 1 signalling. *eLife*, 3, e02196.

FREAL, A.; FASSIER, C.; LE BRAS, B.; BULLIER, E.; DE GOIS, S.; HAZAN, J.; HOOGENRAAD, C. C. & COURAUD, F. (2016). Cooperative Interactions between 480 kDa Ankyrin-G and EB proteins assemble the axon initial segment. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(16), 4421-4433.

- GAO, Y.; HUANG, X.; ZHU, Y. & LV, Z. (2018). A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 39(4), 351-364.
- GARCÍA MERINO, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301-306.
- GLANVILLE, J.; KUO, T. C.; VON BÜDINGEN, H.-C.; GUEY, L.; BERKA, J.; SUNDAR, P. D.; HUERTA, G.; MEHTA, G. R.; OKSENBERG, J. R.; HAUSER, S. L.; COX, D. R.; RAJPAL, A. & PONS, J. (2011). Naive antibody gene-segment frequencies are heritable and unaltered by chronic lymphocyte ablation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20066-20071.
- GROFF, K.; ALLEN, D.; CASEY, W. & CLIPPINGER, A. (2020). Increasing the use of animal-free recombinant antibodies. *ALTEX*, 37(2), 309–311.
- GUILBERT, C.; CHOU, H.; BOLT, A. M.; WU, T. H.; LUO, V. M.; ORTHWEIN, A. & MANN, K. K. (2020). A functional assay to assess toxicity during murine B cell development in vitro. *Current Protocols in Toxicology*, 83(1), e91.
- HEDSTROM, K. L.; XU, X.; OGAWA, Y.; FRISCHKNECHT, R.; SEIDENBECHER, C. I.; SHRAGER, P. & RASBAND, M. N. (2007). Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *The Journal of cell biology*, 178(5), 875–886.
- HUH, S. H.; DO, H. J.; LIM, H. Y.; KIM, D. K.; CHOI, S. J.; SONG, H.; KIM, N. H.; PARK, J. K.; CHANG, W. K.; CHUNG, H. M. & KIM, J. H. (2007). Optimization of 25 kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 35(3), 165–171.
- HUNTER, M.; YUAN, P.; VAVILALA, D. & FOX, M. (2019). Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current protocols in protein science*, 95(1), e77.
- JAZAYERI, S. H.; AMIRI-YEKTA, A.; BAHRAMI, S.; GOURABI, H.; SANATI, M. H. & KHORRAMIZADEH, M. R. (2018). Vector and cell line engineering technologies toward recombinant protein expression in mammalian cell lines. *Applied biochemistry and biotechnology*, 185(4), 986–1003.
- JONES, S. L. & SVITKINA, T. M. (2016). Axon initial segment cytoskeleton: architecture, development, and role in neuron polarity. *Neural plasticity*, 2016, 6808293.
- KANDEL, E.R.; SHWARTZ, J.H. & JESSELL, T.M. (1997). *Neurociencia y conducta*. Editorial Prentice Hall. Madrid.
- KASPAR, B. K.; VISSEL, B.; BENGOCHEA, T.; CRONE, S.; RANDOLPH-MOORE, L.; MULLER, R.; BRANDON, E. P.; SCHAFFER, D.; VERMA, I. M.; LEE, K.-F.; HEINEMANN, S. F. & GAGE, F. H. (2002). Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2320-2325.
- KAUFMANN, STEFAN H. E. (2017). Remembering Emil von Behring: from tetanus treatment to antibody cooperation with phagocytes. *mBio*. 8(1), e00117–17.
- KENDLER, K. (2012). The dappled nature of causes of psychiatric illness: replacing the organic-functional/hardware–software dichotomy with empirically based pluralism. *Molecular Psychiatry*, 17(4), 377-388.
- KHAN K. H. (2013). Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 3(2), 257–263.

- KNIGHT K.; BURNETT R. & MCNICHOLAS, J. (1985). Organization and polymorphism of rabbit immunoglobulin heavy chain genes. *Journal of immunology*, 134(2), 1245-1250.
- KOBAYASHI, N. & OYAMA, H. (2011). Antibody engineering toward high-sensitivity high-throughput immunosensing of small molecules. *The Analyst*, 136(4), 642-651.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.
- KONONENKO, N. L.; DIRIL, M. K.; PUCHKOV, D.; KINTSCHER, M.; KOO, S. J.; PFUHL, G.; WINTER, Y.; WIENISCH, M.; KLINGAUF, J.; BREUSTEDT, J.; SCHMITZ, D.; MARITZEN, T. & HAUCKE, V. (2013). Compromised fidelity of endocytic synaptic vesicle protein sorting in the absence of stonin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), E526–E535.
- KWON, S. K.; SANDO, R.; 3RD, LEWIS, T. L.; HIRABAYASHI, Y.; MAXIMOV, A. & POLLEUX, F. (2016). LKB1 regulates mitochondria-dependent presynaptic calcium clearance and neurotransmitter release properties at excitatory synapses along cortical axons. *PLoS biology*, 14(7), e1002516.
- LIN, Y. C.; BOONE, M.; MEURIS, L.; LEMMENS, I.; VAN ROY, N.; SOETE, A.; REUMERS, J.; MOISSE, M.; PLAISANCE, S.; DRMANAC, R.; CHEN, J.; SPELEMAN, F.; LAMBRECHTS, D.; VAN DE PEER, Y.; TAVERNIER, J. & CALLEWAERT, N. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature communications*, 5, 4767.
- LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J. & WEIS-GARCIA, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*, 46(3), 258-268.
- LIU, L. & LUCAS, A. H. (2003). IGH V3-23*01 and its allele V3-23*03 differ in their capacity to form the canonical human antibody combining site specific for the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b. *Immunogenetics*, 55(5), 336-338.
- LONGO, P. A.; KAVRAN, J. M.; KIM, M. S. & LEAHY, D. J. (2013). Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in enzymology*, 529, 227-240.
- LU, T.; PAN, Y.; KAO, S. Y.; LI, C.; KOHANE, I.; CHAN, J. & YANKNER, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994), 883-891.
- LUONI, A.; MASSART, R.; NIERATSCHKER, V.; NEMODA, Z.; BLASI, G. (2016). Ankyrin-3 as a molecular marker of early-life stress and vulnerability to psychiatric disorders. *Translational psychiatry*, 6(11), e943.
- MA, H. & O'KENNEDY, R. (2015). The structure of natural and recombinant antibodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1348, 7-11.
- MANNING, C. F.; BUNDROS, A. M. & TRIMMER, J. S. (2012). Benefits and pitfalls of secondary antibodies: why choosing the right secondary is of primary importance. *PloS one*, 7(6), e38313.
- MCNAMARA J, EUBANKS J, MCPHERSON J, WASMUTH J, EVANS G, HEINEMANN S. (1992). Chromosomal localization of human glutamate receptor genes. *The Journal of Neuroscience*, 12(7):2555-2562.
- MEYER, D.; BONHOEFFER, T. & SCHEUSS, V. (2014). Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*, 82(2), 430-443.
- MILLER, R. A.; MALONEY, D. G.; WARNKE, R. & LEVY, R. (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *The New England journal of medicine*, 306(9), 517-522.

- MORRISON, S. L.; JOHNSON, M. J.; HERZENBERG, L. A. & OI, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(21), 6851-6855.
- MOUNTAIN, A. & ADAIR, J. R. (1992). Engineering antibodies for therapy. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 10, 1-142.
- NELSON, A. D.; CABALLERO-FLORÁN, R. N.; RODRÍGUEZ DÍAZ, J. C.; HULL, J. M.; YUAN, Y.; LI, J.; CHEN, K.; WALDER, K. K.; LOPEZ-SANTIAGO, L. F.; BENNETT, V.; MCINNIS, M. G.; ISOM, L. L.; WANG, C.; ZHANG, M.; JONES, K. S. & JENKINS, P. M. (2018). Ankyrin-G regulates forebrain connectivity and network synchronization via interaction with GABARAP. *Molecular Psychiatry*.
- NICOLLE, C. H. & CONSEIL, E. (1918). Pouvoir preventif du serum d'un malade convalescent de rougeole. *Bulletins et memoires de la Societe medicale des hopitaux de Paris*, 42, 337.
- NORTH, B.; LEHMANN, A. & DUNBRACK, R. L. (2011). A new clustering of antibody CDR loop conformations. *Journal of Molecular Biology*, 406(2), 228-256.
- NUTT, S. L.; HODGKIN, P. D.; TARLINTON, D. M. & CORCORAN, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews. Immunology*, 15(3), 160-171.
- PARK, I. Y.; CHOWDHURY, P.; TRIPATHI, D. N.; POWELL, R. T.; DERE, R.; TERZO, E. A.; RATHMELL, W. K. & WALKER, C. L. (2016). Methylated α -tubulin antibodies recognize a new microtubule modification on mitotic microtubules. *mAbs*, 8(8), 1590-1597.
- PEDRIQUE, S. & FAZZARI, P. (2010). Nrg1 Reverse Signaling in Cortical Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 15005-15006.
- PICKARD, L.; NOËL, J.; HENLEY, J. M.; COLLINGRIDGE, G. L. & MOLNAR, E. (2000). Developmental Changes in Synaptic AMPA and NMDA Receptor Distribution and AMPA Receptor Subunit Composition in Living Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 7922-7931.
- REICHARDT, L. F. & MATTHEW, W. D. (1982). Monoclonal antibodies. Applications to studies on the chemical synapse. *Trends in Neurosciences*, 5, 24-31.
- RICHMOND, S. A.; IRVING, A. J.; MOLNAR, E.; MCILHINNEY, R. A.; MICHELANGELI, F.; HENLEY, J. M. & COLLINGRIDGE, G. L. (1996). Localization of the glutamate receptor subunit GluR1 on the surface of living and within cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 75(1), 69-82.
- ROMANO, P.; MANNIELLO, A.; ARESU, O.; ARMENTO, M.; CESARO, M. & PARODI, B. (2009). Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D925-D932.
- SAIZ, J.; VEGA, D. & PÁEZ, P. (2010). Bases neurobiológicas de la esquizofrenia. *Clínica y Salud*, 21(3), 235-254.
- SAKURAI, A.; DOÇI, C. L. & GUTKIND, J. S. (2017). Using Heterologous COS-7 cells to identify semaphorin-signaling components. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1493, 163-170.
- SANZ, L.; CUESTA, Á. M.; COMPTE, M. & ÁLVAREZ-VALLINA, L. (2005). Antibody engineering: Facing new challenges in cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26(6), 641-648.
- SCHLÜTER, A.; ROSSBERGER, S.; DANNEHL, D.; JANSSEN, J. M.; VORWALD, S.; HANNE, J.; SCHULTZ, C.; MAUCERI, D. & ENGELHARDT, M. (2019). Dynamic regulation of synaptopodin and the axon initial segment in retinal ganglion cells during postnatal development. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 318.

- SHEPARD, H. M.; PHILLIPS, G. L.; D THANOS, C. & FELDMANN, M. (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clinical Medicine*, 17(3), 220-232.
- SIEGEL, D. L. (2002). Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfusion Clinique et Biologique*, 9(1), 15-22
- SORENSEN, R. U.; TOMFORD, J. W.; GYVES, M. T.; JUDGE, N. E.; POLMAR, S. H. (1984). Use of intravenous immune globulin in pregnant women with common variable hypogammaglobulinemia. *American Journal of Medicine*, 76, 91-100.
- TAKAMORI, S.; RHEE, J. S.; ROSENMUND, C. & JAHN, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 407(6801), 189-194.
- TAMAKI, Y.; SHODAI, A.; MORIMURA, T.; HIKIAMI, R.; MINAMIYAMA, S.; AYAKI, T.; TOOYAMA, I.; FURUKAWA, Y.; TAKAHASHI, R. & URUSHITANI, M. (2018). Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals. *Scientific Reports*, 8(1), 6030.
- THE ANTIBODY REGISTRY (2020). Consultado a 28/06/2020. <https://antibodyregistry.org/search>
- TISELIUS, A. & KABAT, E. A. (1938). Electrophoresis of immune serum. *Science*, 87(2262), 416-417.
- TOWNSEND, C. L.; LAFFY, J. M.; WU, Y. B.; SILVA O'HARE, J.; MARTIN, V.; KIPLING, D.; FRATERALI, F. & DUNN-WALTERS, D. K. (2016). Significant differences in physicochemical properties of human immunoglobulin kappa and lambda CDR3 Regions. *Frontiers in immunology*, 7, 388.
- TRILL, J. J.; SHATZMAN, A. R. & GANGULY, S. (1995). Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Current opinion in biotechnology*, 6(5), 553-560.
- VIDARSSON, G.; DEKKERS, G. & RISPENS, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.
- WALDMANN, H. (2019). Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1904, 1-10.
- WATSON, C. T. & BREDEN, F. (2012). The immunoglobulin heavy chain locus: Genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes & Immunity*, 13(5), 363-373.
- WEIS-GARCIA, F. & CARNAHAN, R. H. (2017). Characterizing Antibodies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(11), pdb.top093823.
- WEISSMAN, T. A. & PAN, Y. A. (2015). Brainbow: New resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis. *Genetics*, 199(2), 293-306.
- WOOF, J. M. & BURTON, D. R. (2004). Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature Reviews. Immunology*, 4(2), 89-99.
- WOOTLA, B.; DENIC, A. & RODRIGUEZ, M. (2014). Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1060, 79-110.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines, 2019. *WHO technical report series; 1021*. World Health Organization. Geneva.
- YU, J.; SONG, Y. & TIAN, W. (2020). How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *Journal of Hematology & Oncology*, 13.

8. ANEXO

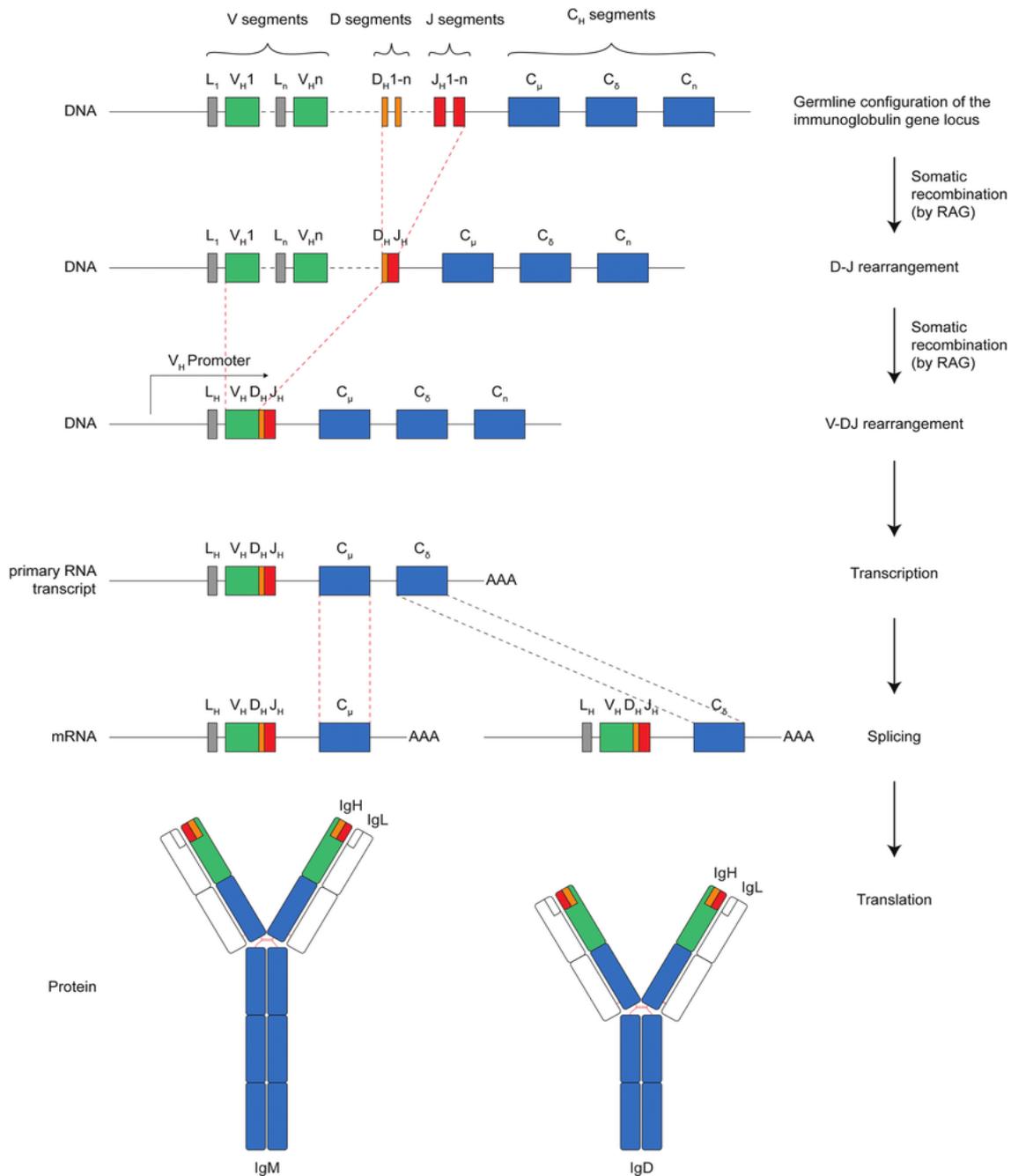


Figura suplementaria 1. Esquema de la recombinación V(D)J en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas a partir de segmentos génicos del linfocito B germinal. El locus de una inmunoglobulina está organizado en diferentes segmentos: segmento génico variable (V), de diversidad (D), de unión (J) y constante (C). La región variable comprende los segmentos génicos V, D y J se genera por recombinación aleatoria de estas secuencias. L = secuencia líder. Las recombinaciones somáticas se dan gracias a la acción de genes activadores de recombinación (RAG), que codifican los enzimas RAG-1 y RAG-2, los cuales separan, mezclan y vuelven a unir los genes VDJ. Las diferentes combinaciones de VDJ pueden dar lugar hasta a 10^9 clones de células B diferentes (BACKHAUS, 2018).

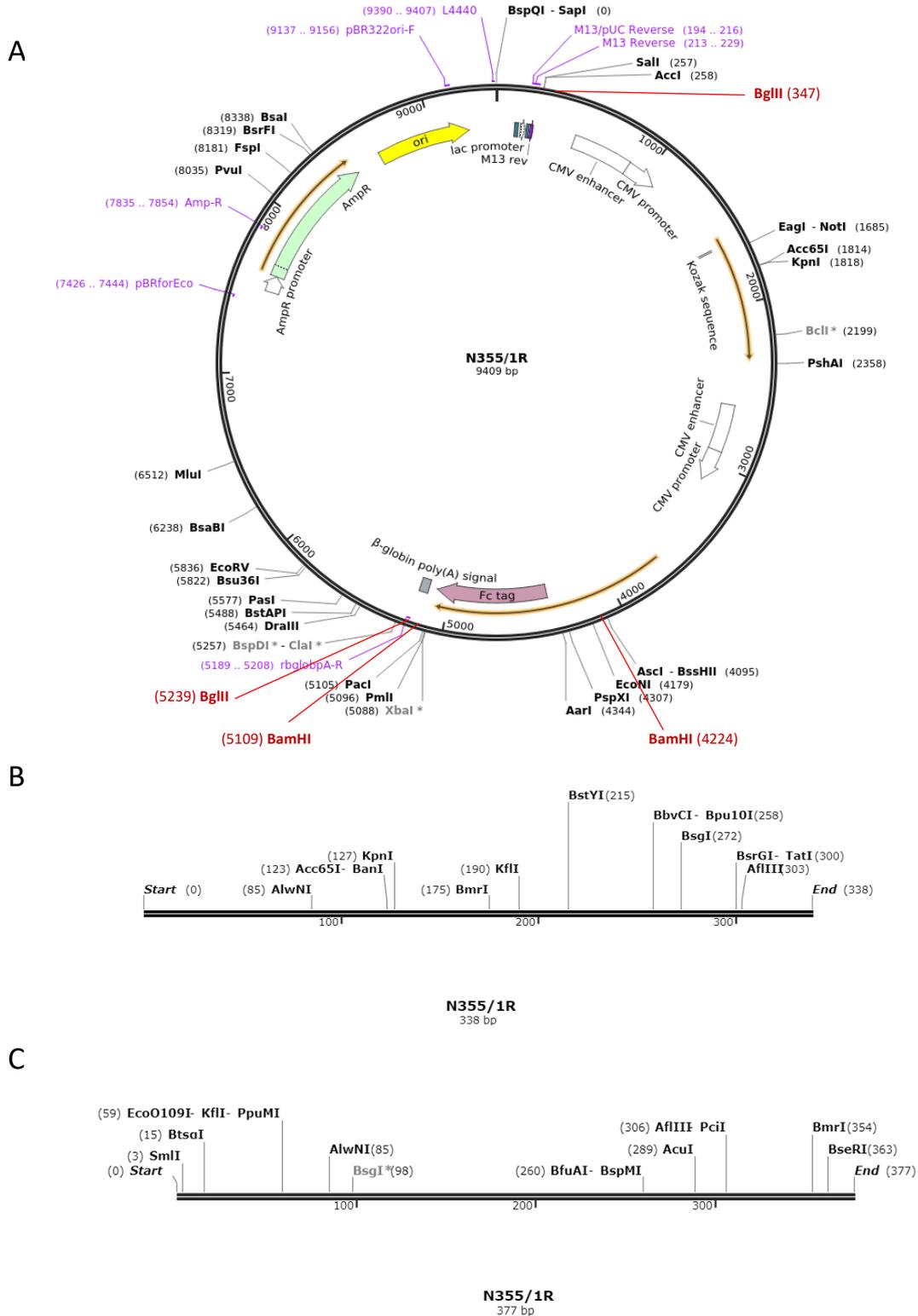


Figura suplementaria 2. A) Esquema de los elementos del plásmido de expresión del anticuerpo anti-GluR1. Se destacan en rojo los enzimas utilizados y sus sitios de corte. B) ORF1: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena ligera. C) ORF2: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena pesada. Figura adaptada de Addgene (<http://n2t.net/addgene:114483>; RRID: Addgene_114483).

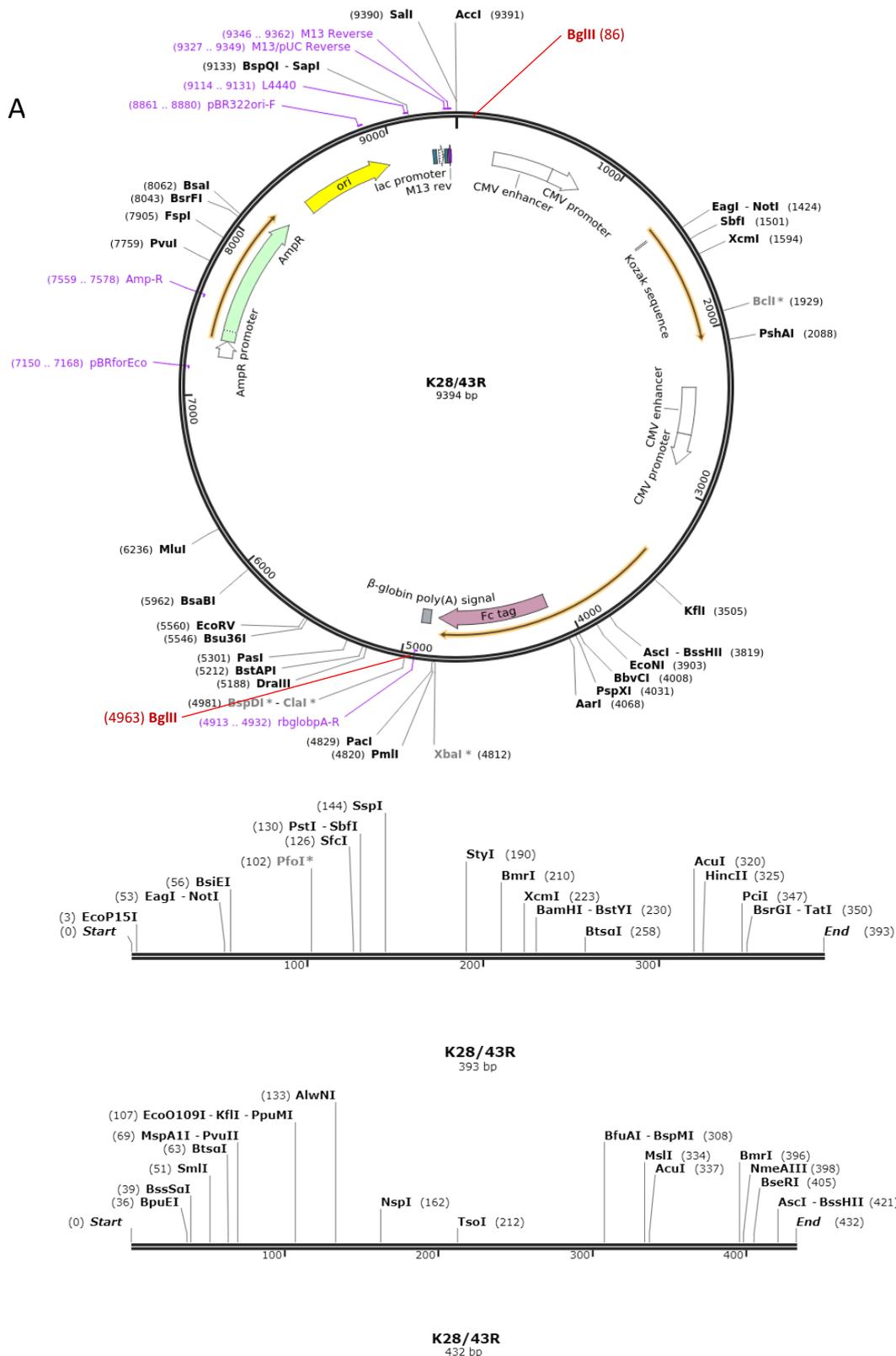


Figura suplementaria 4. A) Esquema de los elementos del plásmido de expresión del anticuerpo anti-PSD-95. Se destaca en rojo el enzimas utilizado y sus sitios de corte. B) ORF1: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena ligera. C) ORF2: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena pesada. Figura adaptada de Addgene (<http://n2t.net/addgene:128618>; RRID: Addgene_128618).

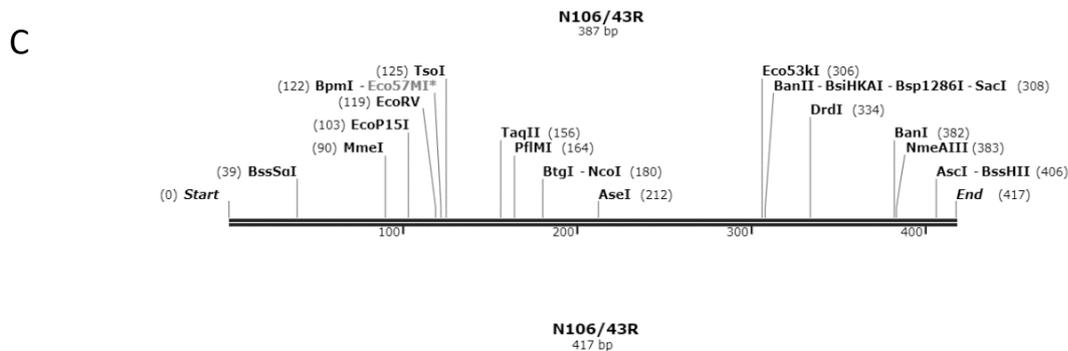
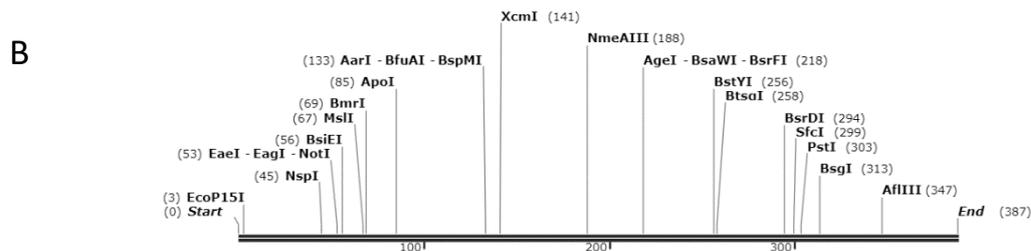
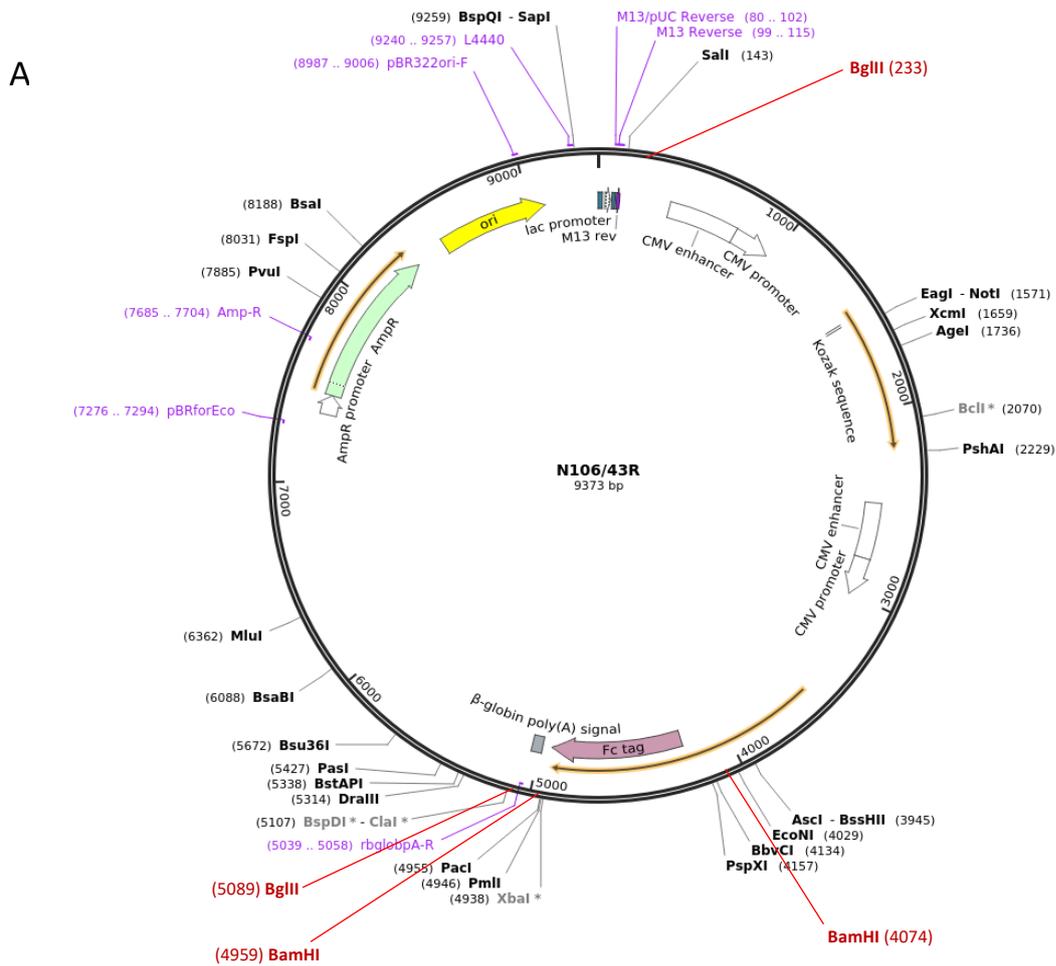


Figura suplementaria 5. A) Esquema de los elementos del plásmido de expresión del anticuerpo anti-Ank-G. Se destacan en rojo los enzimas utilizados y sus sitios de corte. B) ORF1: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena ligera. C) ORF2: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena pesada. Figura adaptada de Addgene (<http://n2t.net/addgene:128635>; RRID: Addgene_128635).

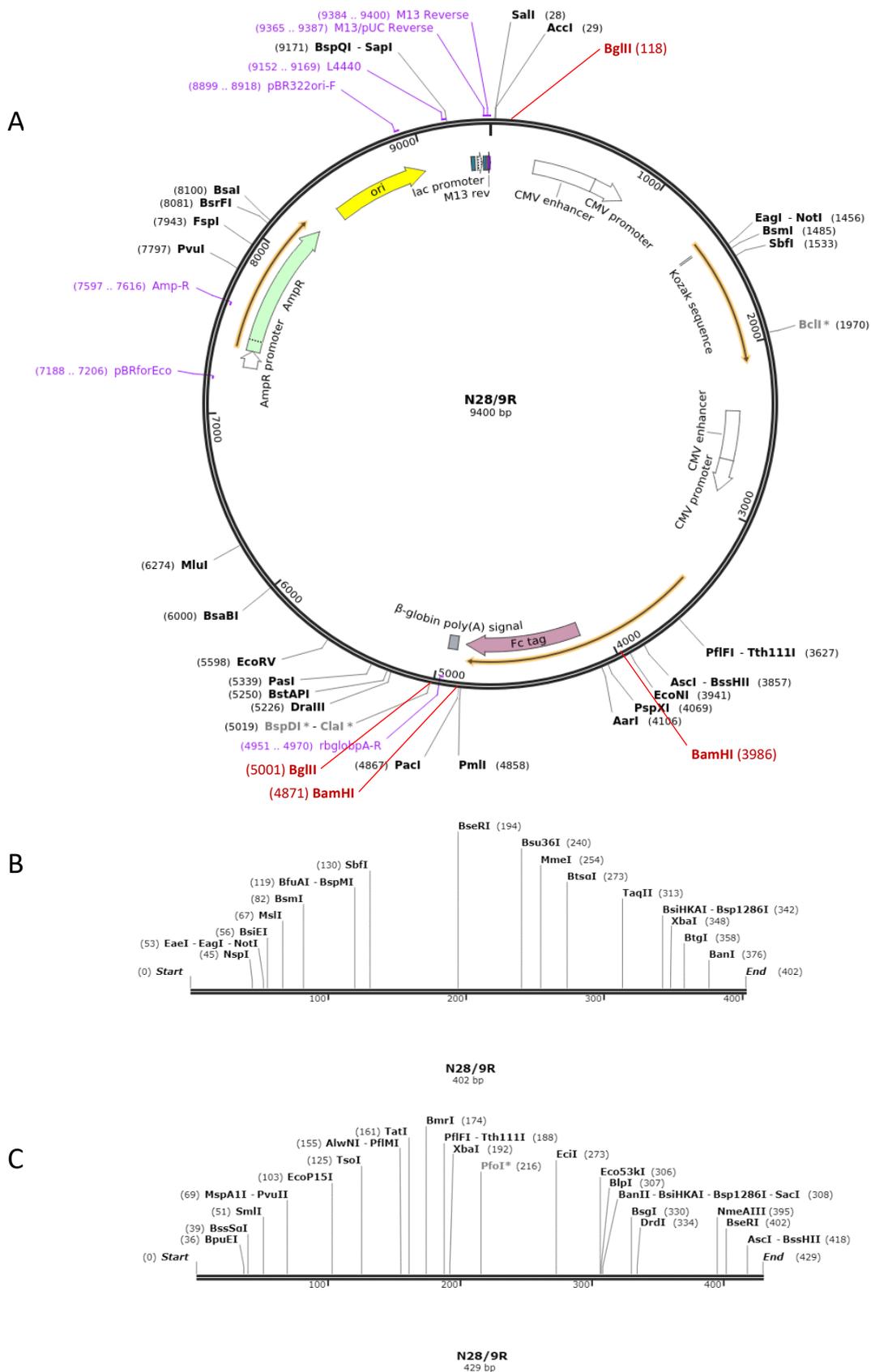


Figura suplementaria 6. A) Esquema de los elementos del plásmido de expresión del anticuerpo anti-VGluT1. Se destacan en rojo los enzimas utilizados y sus sitios de corte B) ORF1: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena ligera. C) ORF2: inserto correspondiente al dominio variable de la cadena pesada. Figura adaptada de Addgene (<http://n2t.net/addgene:128638>; RRID: Addgene_128638).

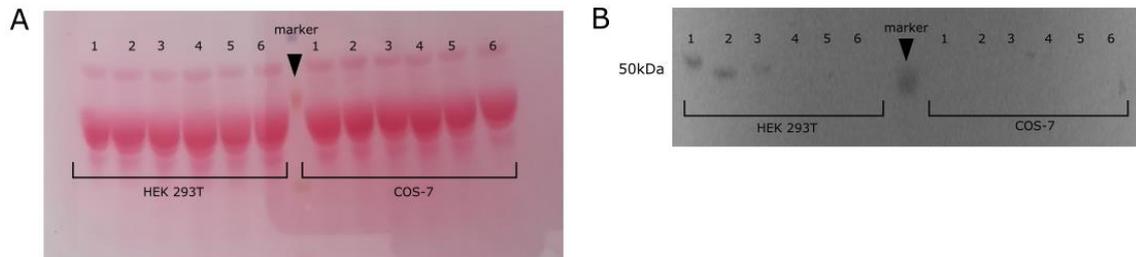


Figura suplementaria 7. Análisis mediante Western blot de la expresión de los anticuerpos recombinantes en las líneas celulares HEK 293T y COS-7. Tras realizar una SDS-PAGE con los distintos sobrenadantes, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. A) Tinción inespecífica con rojo Ponceau S de la membrana que contiene las proteínas del sobrenadante de ambas líneas celulares. Se pueden observar la totalidad de proteínas transferidas electroforéticamente. B) Membrana de PVDF después de ser incubada con anticuerpo secundario anti-ratón marcado con HRP a dilución 1:2000. 1: anti-GluR1; 2: anti-GFP; 3: anti-PSD-95; 4: anti-Ank-G; 5: anti-VGluT1, 6: GFP. Se observan bandas a aproximadamente 50 kDa en los pocillos 1,2 y 3 del sobrenadante de las células HEK 293T, que corresponde al peso molecular de una cadena pesada de un anticuerpo.