

UCH-FC
Biotecnología
C331
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA DE CAPTURA PARA LA
MEDICIÓN DE LA FORMA SOLUBLE DEL RECEPTOR TIPO
TOLL 2 EN PLASMA HUMANO

Seminario de Título

Entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Salvador Carvajal Muñoz

Octubre, 2009

Santiago, Chile



Director de Seminario de Título: Dra Marcela Hermoso Ramello



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **SR. SALVADOR CARVAJAL MUÑOZ**

“ESTANDARIZACIÓN DE UN ELISA DE CAPTURA PARA LA MEDICIÓN DE LA FORMA SOLUBLE DEL RECEPTOR TIPO TOLL 2 EN PLASMA HUMANO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. *Marcela Hermoso Ramello*

Directora Seminario de Título

Comisión de Evaluación

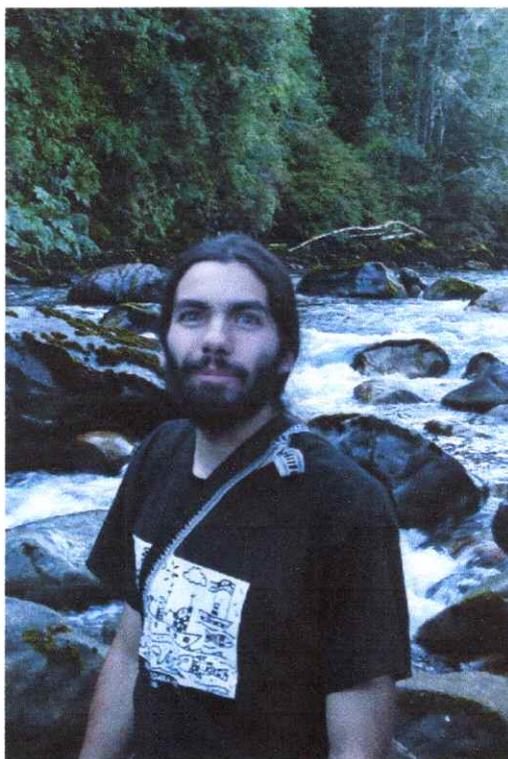
Dr. Mario Roseblatt Silber

Presidente Comisión

Dra. María Inés Becker Contreras
Correctora



Mi Biografía



Mi nombre es Salvador Carvajal Muñoz y nací en Santiago, ciudad en la que sigo viviendo. Egresé de enseñanza media en el colegio San Ignacio A.O. Posteriormente ingresé el año 2003 a la Escuela de Ciencias de la Universidad de Chile, a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. En el año 2006, participé de los trabajos prácticos electivos del curso de inmunología, a cargo de la Dra. Rosa Bono. En paralelo, ingresé a la empresa Lumisolar, prestando servicios en el área de desarrollo tecnológico. En marzo del 2007 me incorporé al Laboratorio de Inmunidad Innata en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile a cargo de la Dra. Marcela Hermoso. En este lugar, durante mi primer semestre, llevé a cabo una unidad de investigación, en torno a la medición en humanos del receptor tipo Toll 2. Mientras, en la Escuela de Ciencias, participé del proyecto "Museo Interactivo Itinerante" financiado por el Premio Azul. En Agosto del 2007, continuando el trabajo de la unidad de investigación, comencé el seminario de título que en este documento se presenta.



...Al hermano Frano Malinarich...

Agradecimientos

Llegué al laboratorio de Inmunidad Innata con el fin del verano del año 2007, buscando un lugar para conseguir entrenamiento práctico y comenzar mi investigación. Quedé en tutela de Lucía, que tomando con dedicación su labor, me enseñó los métodos y el orden del trabajo, y vigiló mis primeros pasos. Valoro la disposición de Lucía sobre todo durante el 2007, compartiendo conmigo detalles que hacen posibles los experimentos, y otros que los hacen más rápidos de desarrollar. Posteriormente, recibí la orientación en herramientas básicas de biología molecular de parte de David y Pati, y también de las vecinas de piso del laboratorio de virología. Les estoy en deuda por las múltiples ocasiones en que me ayudaron en el diseño y desarrollo de experimentos y en el análisis de los resultados que me mantuvieron ocupado durante el 2008. También tuve la suerte de comenzar mis cultivos celulares bajo el auxilio de Enzo, Rodrigo y Ramón, que saben muy bien como tratar a un eucarionte, y como purificarles de los más inverosímiles parásitos. Este fue el entrenamiento que llegué buscando, me voy satisfecho de éstos frutos, sin embargo, no es lo único que encontré.

El lado B de este laboratorio tiene un mestizaje sabroso. El calor de la tarde es refrescado por el lobo Enzo que gota sus energías defendiendo la honestidad y la nobleza, y por el sabio Frano, sensible a los dolores de sus pares. A la hora del almuerzo, Lucía, Carol y Marcela siembran la discusión política en nombre del estudiantado de posgrado, reflejo de su interés por el devenir de los estudiantes. David, el andinista, describe los orígenes de los vicios sociales actuales, esperanzado del cambio, mientras Pati nos defiende de las pulsiones productivas, crítica del hombre-máquina moderno. Es un almuerzo que nos humaniza. La autoridad sin duda corresponde a Don Roli, que ha visto el suceder de cuantos estudiantes, todos visitas desde su punto de vista. Aún así nos sirve como si fuéramos dueños de casa con calidad y entrega, y nos sabe animar en nuestros malos momentos. Por eso se ha ganado nuestro respeto, y corazón. Otros personajes que ya han partido hacia otros vientos, visitan de vez en cuando éste lugar, como es el caso de Ramón y Rodrigo, les recibimos con alegría, por haber contribuido a los cimientos de éste lugar: algunos pilares experimentales, y otros, pilares de grupo humano.

El desarrollo de este seminario, tuvo momentos de gran dificultad, y el sobrepasarlos ha dejado una enseñanza muy valiosa para mí. El cumplimiento de esta meta fue posible



gracias al apoyo permanente que recibí de mi novia Danzarina. También recibí fuerzas desde mi hogar, por un lado de mi mamá y mis hermanos, y por otro de mi papá. Ha sido importante para mí que hayan acompañado este trabajo.

Finalmente agradezco a Marcela, el darme un espacio en este laboratorio, y en particular que haya permitido desarrollar esta tesis en paralelo con mi trabajo técnico en Lumisolar.



Índice



0.1. Lista de abreviaturas	IX
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. La familia de receptores tipo Toll	3
1.2. Respuesta de acuerdo al patógeno	5
1.3. La inflamación y su control	6
1.4. Formas solubles de proteínas de membrana	9
1.5. Determinación de sTLR2 en plasma	12
1.6. Objetivos	13
2. Materiales y Métodos	14
2.1. ELISA de captura	14
2.2. Avance en el desarrollo de TLR2 recombinante	15
3. Resultados	17
3.1. Tampón de sensibilización, proteína de bloqueo y sistema de detección . . .	17
3.1.1. Pruebas con anticuerpo de captura monoclonal y rTLR2	20
3.2. Avance en el desarrollo de TLR2 recombinante	24
4. Discusión	28
4.1. ELISA de captura para TLR2	29
4.2. Estrategia para el desarrollo de TLR2 recombinante	31
5. Conclusión	32
Referencias	33

Índice de figuras

1. sTLR2 en la respuesta inflamatoria	11
2. Diagrama del ELISA de captura	15
3. Efecto de solución de bloqueo y tampón de sensibilización	18
4. Funcionalidad del sistema de detección	19
5. Máxima señal de OD en ELISA directo a diluciones intermedias de plasma .	20
6. Curva estándar de rTLR2 en ELISA de captura con monoclonal, clon TL2.1	21
7. Interacción entre anticuerpos es débil frente a la unión a rTLR2	22
8. Dilución del anticuerpo de detección disminuye la OD inespecífica	23
9. Detección de rTLR2 en plasma	24
10. Análisis del plasmidio pFLAG-CMV-TLR2	25
11. Amplificación por PCR de secuencia de TLR2	27
12. Curva teórica de unión específica V/S no específica del anticuerpo policlonal	30

Índice de cuadros

1. Detalle de la reacción de PCR para hTLR2	16
---	----



0.1. Lista de abreviaturas

AP-1	<i>Activator protein 1</i>
CMV	Citomegalovirus
CpG-DNA	Islas de CpG, regiones de DNA con una mayor frecuencia de CGs
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
IFN- β	Interferón β
ICAM-1	<i>Inter-celular adhesion molecule 1</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IP-10	<i>IFN-γ inducible protein 10</i>
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
LPS	Lipopolisacárido
LRRs	Repeticiones ricas en leucina
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIC-A,B	Homólogos del complejo principal de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteinasa de matriz
mRNA	RNA mensajero
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF- κ B	Factor Nuclear κ B
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2</i>
OD	Densidad óptica

RANTES	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rTLR2	Proteína recombinante de TLR2
SHP-1	<i>SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1</i>
SIGIRR	<i>Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor domain</i>
SOCS	Familia de proteínas supresoras de señalización por citoquinas
sTLR2	Formas soluble del receptor tipo Toll 2
Str-HRP	Estreptavidina HRP
TACE	Enzima convertidora de TNF- α
TIR	Dominio Toll-IL-1R
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing IFN-β</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia humana

Resumen

Los receptores tipo Toll (TLRs) son proteínas transmembrana capaces de unir patrones moleculares asociados a microorganismos. La activación de estos receptores conduce al desarrollo de la respuesta inmune innata al desencadenar la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-12. Todos los TLRs tienen un dominio intracelular de señalización TIR (Toll-IL-1R domain) presente también en las proteínas de la familia del receptor de IL-1 (IL-1R). La especificidad de los TLRs por sus ligandos y el reclutamiento de diferentes proteínas intracelulares que activan la vía de señalización posibilitan variadas respuestas inflamatorias de acuerdo con la naturaleza del patógeno. Sin embargo, la respuesta inflamatoria inducida puede llegar a ser destructiva para el propio huésped, lo que subraya la importancia de mecanismos de regulación negativa de la misma. Las formas solubles de algunos TLRs (sTLR2, sTLR4) han sido identificadas. Estas formas solubles son incapaces de gatillar cascadas de señalización intracelulares y pueden atenuar la respuesta inmune tras competir con sus homólogos de membrana por sus ligandos. La capacidad de las formas de sTLR2 de atenuar la producción de citoquinas proinflamatorias se ha demostrado *in vitro*. La medición de los niveles de sTLR2 en enfermedades directamente asociadas al desequilibrio de la respuesta inflamatoria (enfermedades inflamatorias intestinales, artritis reumatoide, lupus, etc) puede esclarecer el papel de sTLR2 en la modulación de la respuesta inmune. En base a estos antecedentes el objetivo general de este seminario de título de biotecnología fue establecer las condiciones para desarrollar un ELISA de captura para sTLR2. Los objetivos específicos fueron: 1. Establecer las condiciones necesarias para la medición de sTLR2 en plasma por ELISA de captura, y 2. Diseñar herramientas que permitan el desarrollo de una proteína recombinante de TLR2 humano para ser utilizada en la curva de calibración del ELISA de captura. Se logró el desarrollo del ELISA de captura con una curva estándar entre 20 y 320 ng/mL de proteína recombinante de TLR2 (rTLR2). En plasma, se observó interferencia en la detección de rTLR2, que subraya la necesidad de aplicar un tratamiento previo a las muestras para lograr medir sTLR2 endógeno. Por otro lado, se amplificó por PCR la secuencia codificante de TLR2 humano, con los sitios de restricción necesarios para su incorporación en el vector de expresión bacteriano pET-21(+). El ensayo logrado durante este seminario permitirá la medición de sTLR2 en enfermedades inflamatorias o autoinmunes para ampliar la comprensión de éstas enfermedades y, con esto, desarrollar terapias de nueva generación enfocadas en la actividad de TLR2.

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins capable of sensing Microorganisms Associated Molecular Patterns. Their activation triggers pro-inflammatory cytokines production such as TNF- α , IL-6 and IL-12, thus starting the innate immune response. All the TLRs show an intracellular signaling TIR (Toll/IL-1R) domain which is also present in IL-1R-like proteins. The TLRs specificity about their ligands and the different intracellular proteins that induce the signaling pathway, ensures distinct inflammatory responses according with the pathogen's nature. However the inflammatory response can become destructive to the host. This possibility underlines the importance of the negative regulation of inflammation. Soluble forms of TLRs (sTLR2, sTLR4) had been identified. The soluble forms, even though they can not trigger the intracellular signaling cascade, could down-regulate the immune response by sequestering ligands of the membrane attached TLRs. It had been demonstrated the ability of sTLR2 to down-regulate the production of pro-inflammatory cytokine *in vitro*. The measurement of the sTLR2 levels in diseases associated with inflammatory unbalanced response (inflammatory intestinal diseases, arthritis, lupus) may clarify the role of sTLR2 in the immune response modulation. The general aim of this biotechnology title seminar was to standardize the necessary conditions for the development of the sTLR2 capture ELISA. The specific objectives were: 1. To set up the necessary condition to measure plasma sTLR2 by capture ELISA and 2. To design the tools that allows a TLR2 recombinant protein development to be used for the capture ELISA standard curve. A capture ELISA with a standard curve between 20 and 320 ng/mL of TLR2 recombinant protein (rTLR2) was achieved. Interference in rTLR2 detection was observed in plasma, highlighting the need for a previous treatment to the samples that allows endogenous sTLR2 measurement. On the other hand, a human TLR2 coding sequence was amplified by PCR with the restrictions sites ends needed for its insertion in the bacterial expression vector pET-21a(+). The assay achieved during this seminar allows the measurement of sTLR2 in inflammatory or autoimmune diseases, useful for the comprehension of these diseases and for the development of therapies of new generation focused in TLR2 activity.

1. Introducción

1.1. La familia de receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (TLRs) se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal¹, y se estudian a fondo en las células del sistema inmune de los mamíferos. Comprenden una familia de proteínas que reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs). Los TLRs se ubican en la membrana celular o de endosomas [AHMAD-NEJAD Y COL. 2002]. Poseen un dominio de señalización, el dominio TIR (*Toll/IL-1R domain*), que está presente también en la familia de proteínas del receptor de IL-1. Tras la activación del TLR, se activa una vía de señalización intracelular, a través del dominio TIR, que conduce a la traslocación de factores de transcripción al núcleo. Como consecuencia de la activación transcripcional de numerosas citoquinas pro-inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e IL-1 β [KAWAI Y AKIRA, 2006], los TLRs protagonizan el inicio de la respuesta inmune innata [AKIRA Y COL. 2006].

Reminiscencias de un pasado numeroso. A diferencia de los receptores clonales de linfocitos, los TLRs están codificados en la línea germinal. Una amplia variedad de estos receptores fue heredada por los ancestros cefalocordados, carentes del repertorio linfocitario [COOPER Y ALDER, 2006]. A lo largo de la transición evolutiva entre invertebrados y vertebrados, el número de TLRs codificados por especie ha disminuido [COOPER Y ALDER, 2006].

En el genoma del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* 222 genes de TLRs han sido estudiados [HIBINO Y COL. 2006]. El anfibio *Branchiostoma floridae* del grupo cefalocordado, posee 42 genes codificantes de TLRs [COOPER Y ALDER, 2006]. En contraste, sólo 10 representantes de los TLRs han sido identificados en humanos [ROCK Y COL. 1998; CHUANG Y ULEVITCH 2000, 2001; TAKEDA Y AKIRA 2005]. También en el linaje invertebrado, *Drosophila* y el mosquito *Anopheles* expresan un número similar de TLRs (9 y 10 respectivamente) más vinculados con procesos del desarrollo que con el sistema inmune [ZHENG Y COL. 2005].

Pese a la variabilidad en el número de TLRs por especie, en los mamíferos el dominio

¹Se ha mostrado la presencia de TLRs en la mayoría de los clados del subreino eumetazoa, con excepción del filum platelminto. Se han hecho estudios funcionales en humano, ratón, nemátodo y mosca [LEULIER Y LEMAITRE, 2008].

de unión a ligando comparte el mismo patrón estructural. Más aún estas proteínas mantienen homología en el dominio intracelular de señalización TIR.

Dominio de unión a ligando. La región de los TLRs que une a los respectivos MAMPs, está formada por un conjunto de repeticiones ricas en leucina (LRRs), que son módulos altamente conservados de 24 aminoácidos [BELL Y COL. 2003]. Los LRRs constituyen andamios que al combinarse forman variados dominios responsables del reconocimiento de diferentes MAMPs. El ectodominio de los TLRs se compone de 19 a 24 LRRs, formando un largo solenoide, que se curva como herradura, ofreciendo una amplia superficie cóncava al ligando. La unión del ligando normalmente implica interacción homo o heterodimérica entre TLRs a través del ectodominio. Por ejemplo los lipopéptidos tri-acilados son reconocidos por el heterodímero TLR2-TLR1, mientras que los lipopéptidos di-acilados son reconocidos por TLR2-TLR6 [ALEXOPOULOU Y COL. 2002; MORR Y COL. 2002; JIN Y COL. 2007].

Dominio de señalización. En la región intracelular de los TLRs se ubica el dominio TIR, responsable de la señalización. El dominio TIR está formado por una hoja- β central rodeada de α -hélices. Las inserciones y deleciones en las secuencias que codifican los bucles que conectan estas estructuras secundarias, denominadas BB o DD, hacen variar el tamaño del dominio TIR entre las diferentes proteínas que lo poseen [XU Y COL. 2000]. Estas comprenden los TLRs, los receptores tipo IL-1R y las proteínas citoplasmáticas que están íntimamente involucradas en la vía de señalización de los TLRs, denominadas proteínas adaptadoras [DUNNE Y O'NEILL, 2003]. La unión del ligando a formas oligoméricas de los TLRs puede desencadenar cambios conformacionales que conducen al acercamiento de sus dominios TIR como es el caso de la activación de TLR9 [LATZ Y COL. 2007]. La importancia de la interacción TIR-TIR radica en que se trata de un proceso específico y por tanto cada dímero de TLRs recluta a una plataforma de adaptadores citoplasmáticos diferente [O'NEILL Y BOWIE, 2007].

1.2. Diferentes respuestas de acuerdo a la naturaleza del patógeno

La participación de diferentes proteínas en la vía de señalización de los TLRs, posibilita respuestas variadas de acuerdo a la naturaleza del patógeno. Cada respuesta es iniciada por la unión de los MAMPs por parte de los TLRs. Por ejemplo TLR2 es específico en el reconocimiento de ácidos lipoteicoicos, lipoproteínas y peptidoglicano de bacterias gram-positivas, y por ende es crítico en la inducción de la respuesta inflamatoria a este tipo de estímulos [ECHCHANNAOUI Y COL. 2002]. Por otro lado TLR4 inicia la respuesta del huésped frente a bacterias gram-negativas, reconociendo LPS [POLTORAK Y COL. 1998]. Un amplio grupo de patógenos flagelados son reconocidos por TLR5, a través del reconocimiento de la proteína flagelina del flagelo bacteriano [HAYASHI Y COL. 2001].

Un grupo diferente de TLRs es responsable de la señalización frente al reconocimiento de DNA o RNA viral. TLR9 reconoce CpG-DNA² presente en citomegalovirus [KRUG Y COL. 2004], y en herpes simplex virus tipo 1 y 2 [HOCHREIN Y COL. 2004; LUND Y COL. 2003]. TLR3 y TLR7 ubicados en la membrana de endosomas, son necesarios para la respuesta a RNA de hebra simple y doble, respectivamente [ALEXOPOULOU Y COL. 2001; DIEBOLD Y COL. 2004].

Vía dependiente de MyD88, Vía Trif. Cuando un TLR determinado reconoce el respectivo MAMP, proteínas adaptadoras que vinculan quinasas intracelulares al receptor, son reclutadas al dominio TIR. La proteína adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) media la interacción con serina-treonina quinasas de la familia IRAK (*Interleukin-1 receptor-associated kinase*) que conduce a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (*Activator protein 1*) principalmente. Una vía de señalización alternativa para los TLRs fue descrita, MyD88-independiente, en la que el adaptador TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β*) media la interacción con quinasas que no pertenecen a la familia IRAK. La vía MyD88-independiente activa al factor IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*) y al factor NF- κ B [KAWAI Y AKIRA, 2006].

Factores NF- κ B e IRF-3. La activación de los factores de transcripción inducida por los TLRs, promueve su traslocación al núcleo y la transcripción de genes que participan

²Los motivos de CpG-DNA se encuentran abundantemente en el genoma de bacterias. El CpG-DNA en vertebrados es mucho menos abundante y suele estar metilado, por lo que tiene poca capacidad inmunogénica [SCHWARTZ Y COL. 1997].

de la inflamación.

El factor IRF-3, una vez en el núcleo activa la transcripción de IFN- β , IP-10 (*IFN- γ inducible protein*) y RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) [MCWHIRTER Y COL. 2004]. Además IRF-3 en combinación con IRF-7 son esenciales para la inducción de los niveles de mRNAs de la familia IFN- α que se observa tras infección con virus [SATO Y COL. 2000].

La traslocación al núcleo de NF- κ B desencadena la transcripción génica de numerosas citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, además de quimioquinas y enzimas inflamatorias, por ejemplo iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) [BARNES Y KARIN, 1997]. La activación de NF- κ B se ha vinculado también con la expresión de moléculas que participan en la adhesión y extravasación de leucocitos, tales como E-Selectina, VCAM-1 e ICAM-1 [CHEN Y COL. 1995]. En conjunto con AP-1, NF- κ B induce la expresión de la metaloproteínasa de matriz MMP-9 que participa de la remodelación de la matriz extracelular [YOKOO Y KITAMURA, 1996], y es necesaria para la migración de leucocitos al sitio de inflamación [RENCKENS Y COL. 2006].

Efectos a nivel celular. La activación de los TLRs favorece la maduración de las células presentadoras de antígenos, caracterizada por un aumento en la expresión de MHC clase II [KAMON Y COL. 2006], y de las moléculas coestimuladoras CD-40, CD-80 y CD-86 [HOEBE Y COL. 2003]. Es decir, los TLRs también participan del inicio de la respuesta inmune adaptable.

Además en macrófagos se ha observado deficiencias en la fagocitosis y en la maduración del fagosoma en ausencia de señalización vía TLRs [BLANDER Y MEDZHITOV 2004].

En conclusión, los TLRs adoptan un rol preponderante en el inicio de la respuesta inflamatoria, y cooperan con la inducción de la respuesta celular adaptable.

1.3. La inflamación y su control

La Inflamación es un mecanismo de emergencia para reestablecer la funcionalidad de un tejido, en circunstancias en que la entrada de agentes patógenos o el daño por trauma, sobrepasan la capacidad natural del tejido de mantener la homeostasis.

Durante el proceso inflamatorio se producen importantes cambios locales en el si-

tio de injuria y a nivel sistémico en cuanto a la distribución de los leucocitos y a la concentración de proteínas plasmáticas importantes en la defensa del organismo.

Cuando el agente patógeno entra en el tejido periférico, las células locales producen mediadores químicos, tales como quimioquinas, TNF- α e IL-1, que por un lado alteran la circulación sanguínea cercana, aumentando el flujo vascular y la permeabilidad de los capilares, y por otro inducen la migración de células fagocíticas hacia el sitio de injuria. Neutrófilos y monocitos llegan al sitio local desde la circulación sanguínea interactuando con moléculas de adhesión y factores quimiotácticos. Una vez en el tejido fagocitan gran parte de las bacterias y protozoos que penetran las barreras epiteliales.

Como consecuencia del aumento de la permeabilidad de los vasos, en el sitio de injuria se distingue además un exudado, responsable del aumento de volumen, que contiene proteínas plasmáticas. Entre éstas se encuentran los factores del complemento que al activarse forman un complejo de ataque a las membranas celulares y, por otro lado, generan péptidos con acciones proinflamatorias³.

Sólo una vez que el agente patógeno se ha eliminado, y los restos celulares han sido reabsorbidos, se inicia la regeneración o cicatrización del tejido.

Efectos colaterales de la inflamación. Una vez en el tejido, neutrófilos y macrófagos son activados por patógenos a través de receptores que reconocen MAMPs, incluyendo a los TLRs. Esta activación celular induce la producción de sustancias que promueven la destrucción de los patógenos fagocitados, tales como especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico. Cuando estas células son fuertemente activadas, liberan estas sustancias causando daño también en el tejido del huésped.

Asimismo, los niveles de las proteínas del complemento y fibrinógeno plasmático, que participan de la opsonización de patógenos, son inducidas por citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, en casos extremos de infección, tal como sepsis, estas proteínas participan de la coagulación intravascular diseminada y la falla multi-orgánica, que finalmente produce la muerte [ABBAS Y LICHTMAN 2003].

Por lo tanto la inflamación es una respuesta agresiva contra el patógeno, sin embargo, tiene consecuencias autodestructivas. De esto se desprende la necesidad de controlarla,

³C3a y C5a producen degranulación de células cebadas con liberación de histamina. C5a también es factor quimiotáctico de granulocitos y macrófagos.

una vez que el sistema inmune ha eliminado la infección [NATHAN, 2002], posibilitando la reparación del tejido.

Falla en la regulación negativa de la respuesta inflamatoria. En múltiples instancias del desarrollo del estado inflamatorio y también durante su mantención, existen mecanismos de regulación negativa. Cuando estos mecanismos fallan, la efectividad de la respuesta inflamatoria tiene consecuencias devastadoras para el organismo.

Un ejemplo de esta condición extrema lo constituyen los ratones con deficiencia o ausencia en la expresión de la proteína intracelular tirosina-fosfatasa SHP-1 (*SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*), que participa en la regulación negativa de la señalización de los receptores antigénicos en linfocitos B y T [PLAS Y THOMAS, 1998]. La ausencia de SHP-1 en el ratón conduce al desarrollo de múltiples lesiones inflamatorias que incluyen neumonitis, y que producen la muerte por falla pulmonar [SHULTZ Y COL. 1997].

Otro ejemplo lo representa un integrante de la familia de supresores de señalización por citoquinas (SOCS), SOCS-1, que inhibe la respuesta celular a múltiples citoquinas, entre ellas, IL-6 e IFN- γ . El ratón deficiente para SOCS-1 muestra alto grado de infiltración de monocitos en varios órganos y degeneración de las células parenquimatosas en el hígado, muriendo antes de alcanzar las tres semanas, [STARR Y COL. 1998].

Dentro de la vía de señalización de los TLRs también existen varios reguladores negativos. SIGIRR (*Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor domain*) es una proteína de membrana que contiene un dominio TIR semejante al del receptor de IL-1 tipo I (IL-1R) [THOMASSEN Y COL. 1999]. Su sobreexpresión *in vitro* inhibe la activación de NF- κ B mediada por IL-1 e IL-18. Además el ratón deficiente de SIGIRR presenta dificultad para sobrevivir a una inyección peritoneal de LPS, que conduce a una respuesta inflamatoria aumentada en pulmón y colon [WALD Y COL. 2003]. Por otro lado, MyD88s es una isoforma trunca de MyD88 que no es capaz de fosforilar a IRAK. Por esto, MyD88s se comporta como un inhibidor dominante negativo de la activación de NF- κ B inducida por LPS e IL-1 [JANSSENS Y COL. 2002]. Dentro de la familia IRAK también existe un regulador negativo de la vía de señalización de los TLRs, IRAK-M. Macrófagos derivados del ratón deficiente en IRAK-M muestran un aumento en la producción de IL-6, IL-12 y TNF- α cuando son estimuladas con

ligandos de TLRs [KOBAYASHI Y COL. 2002].

1.4. Formas solubles de proteínas de membrana

Cuando una proteína de membrana es producida también como forma soluble, es posible que la forma soluble mantenga íntegro el dominio de interacción, ya sea con ligandos, sustratos, o con otras proteínas. Cuando la región extracelular de la proteína de membrana mantiene su actividad biológica las consecuencias de la proteína anclada en la membrana, o de la forma soluble son drásticamente diferentes [MURPHY Y COL. 2008].

En efecto, la acción localizada de una proteína de membrana que participa de señalización juxtacrina, se vuelve por el contrario una acción sistémica en el caso de la forma soluble, al poder participar ahora de la señalización paracrina [EHLERS Y RIORDAN, 1991; MASSAGUE, 1990; KRIEGLER Y COL., 1988].

Más aún, en el caso de proteínas receptoras, la forma de membrana y la forma soluble desarrollan en ocasiones papeles antagónicos. El receptor de membrana, al unir el respectivo ligando, produce cambios que inician la señalización respectiva en la célula. En contraposición, la forma soluble del receptor, puede secuestrar al ligando bloqueando la señalización del receptor de membrana.

Ejemplos de participación de formas solubles. La potente citoquina proinflamatoria TNF- α , se encuentra en la célula como proteína de membrana. Su actividad a nivel sistémico es desencadenada rápidamente cuando es clivada desde la superficie de la célula por la enzima convertidora de TNF- α (TACE). Se describe también que los receptores de TNF- α , (TNF- α RA, TNF- α RB) en la membrana celular, son clivados de modo de detener la señalización proinflamatoria, que de otro modo conduce al shock séptico [SMOOKLER Y COL. 2006].

Por otro lado, la apoptosis vía FAS/FASL es inducida en las células tumorales por linfocitos T efectoras. El receptor del *Natural Killer Group 2* (NKG2D) participa de la activación de células NK y de la coestimulación de linfocitos T efectoras, al unir a sus ligandos MIC-A y MIC-B (homólogos del complejo mayor de histocompatibilidad) que se expresan, entre otros, en epitelios tumorales. Sin embargo, el aumento en los niveles circulantes de la forma soluble de MIC-A producida por el clivaje de éste desde la superficie de las

células tumorales, reduce la expresión de NKG2D en linfocitos. Así mientras que MIC-A en membrana potencia la actividad anti-tumoral de los linfocitos, la producción de la forma soluble (sMIC-A) contribuye a la evasión tumoral de la respuesta inmune [GROH Y COL. 2002].

Formas solubles de los receptores tipo Toll. Recientemente, se identificaron las formas solubles de algunos de los receptores tipo Toll (sTLR2 en humano, sTLR4 en ratón) [LEBOUDER Y COL. 2003; IWAMI Y COL. 2000]. Las sTLRs podrían atenuar la respuesta inflamatoria de una manera similar a lo que se observa en la señalización por citoquinas [MANTOVANI Y COL. 2001], donde fragmentos del receptor de membrana, incapaces de desencadenar la señalización intracelular, unen de todas formas a sus respectivos ligandos disminuyendo la probabilidad de encuentro de éstos con los receptores unidos a membrana.

Hasta el momento se han identificado 6 formas de sTLR2 en plasma y leche materna humana; 3 de ellas (de 83, 70 y 66 kDa)⁴ son producidas a partir del receptor de membrana [LEBOUDER Y COL. (2003)]. Sin embargo, se desconoce el mecanismo que las genera. El gen de TLR2 humano se ubica en el cromosoma 4 y se compone de 3 exones. El exón 3, presente en todas las variantes de splicing descritas [HAEHNEL Y COL. 2002], contiene la región codificante para la proteína de 784 aminoácidos. El dominio extracelular, responsable de la unión al ligando contiene 22 LRRs (580 aminoácidos aproximadamente) [JIN Y COL. 2007], en el N-terminal de la proteína. Las distintas formas de sTLR2 también corresponden a diversos fragmentos de la región N-terminal de TLR2, por lo que podrían ser capaces de unir a los ligandos de TLR2.

Particularmente, el suplemento de sTLR2 recombinante atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias *in vitro* [LEBOUDER Y COL. (2003)]. El suero de sujetos infectados con VIH [HEGGELUND Y COL. 2004] y de pacientes tras haber sufrido infarto agudo al miocardio [UELAND Y COL. 2006] presentan bajos niveles de sTLR2. Estos bajos niveles de sTLR2 tendrían un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades, sin embargo, la significancia biológica o clínica de sTLR2 aún no ha sido demostrada.

De acuerdo con el modelo planteado en Figura 1, la disminución de los niveles de sTLR2

⁴La proteína expresada como receptor transmembrana es glicosilada y presenta M_r de 110 kDa [YANG Y COL. 1999].

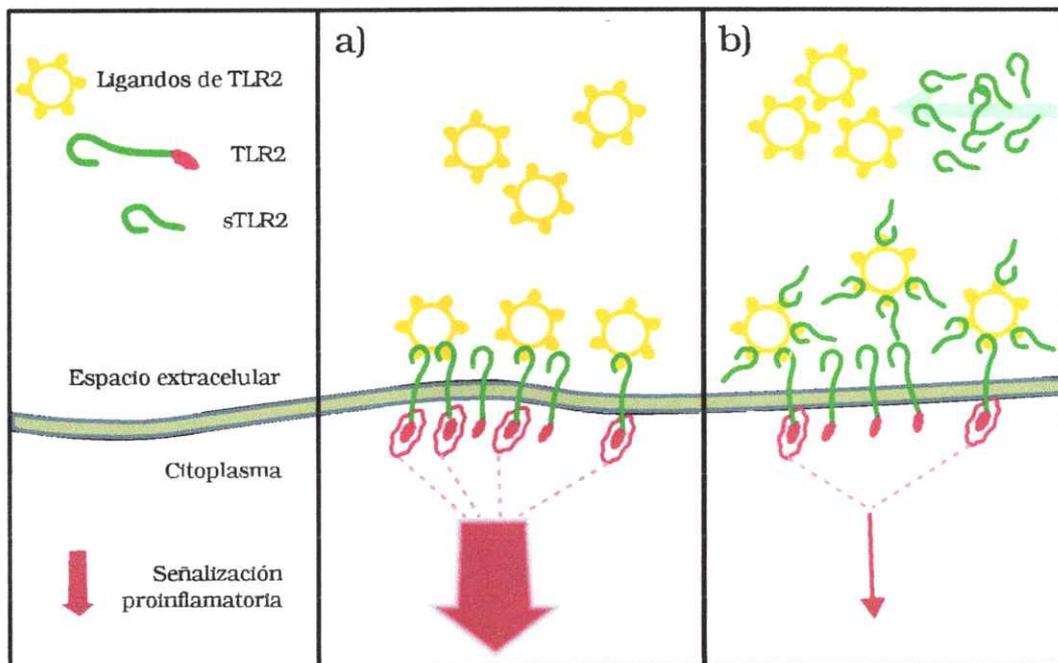


Figura 1: **Papel potencial de sTLR2 en la respuesta inflamatoria.**

En la figura se presenta el modelo de la capacidad de sTLR2 de atenuar la respuesta inflamatoria. En a), los ligandos se encuentran con TLR2 en la membrana celular, iniciando la cascada de señalización intracelular que produce la respuesta inflamatoria. En b), sTLR2 en el espacio extracelular une a los ligandos de manera que estos no puedan ser reconocidos por los TLR2 de membrana, lo que disminuye la señalización intracelular proinflamatoria.

facilita la activación vía MAMPS de las células, lo que refuerza el estado inflamatorio en enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Asimismo, se podría atenuar la inflamación durante la fase activa de estas enfermedades mediante la administración de sTLR2.

La determinación de los niveles de sTLR2 en otras enfermedades, directamente asociadas al desbalance de la respuesta inflamatoria, puede esclarecer el papel de sTLR2 en el desarrollo de este desbalance.

1.5. Determinación de sTLR2 en plasma

Para la determinación de proteínas de plasma existen dos metodologías tradicionales: *western blot* y ensayo inmunoenzimático en fase sólida⁵ (ELISA). Cuando más de una forma de la proteína es detectada en el ensayo, sólo *western blot* permite diferenciar por tamaño las diferentes formas. Sin embargo, para la cuantificación mediante *western blot*, se necesita la comparación con una proteína referencia de la muestra puesto que la intensidad de las bandas tiene escasa reproducibilidad. Para determinaciones cuantitativas en plasma, donde no existe una buena proteína de referencia o de expresión constitutiva, es preferible el ELISA acompañado de una curva de calibración con un estándar de la proteína. La sensibilidad del ELISA permite medir proteínas típicamente en el rango de ng/mL a pg/mL, que representa la concentración biológica de numerosas citoquinas plasmáticas [ANDERSON Y ANDERSON, 2002].

Se ha logrado medir las sTLR2 presentes en plasma humano de sujetos normales o tras haber sufrido infarto agudo al miocardio, a través de ELISA de captura [UELAND Y COL. 2006]. Esta modalidad de ELISA consiste en la adsorción en el pocillo de una placa de un anticuerpo específico contra la proteína a medir, denominado anticuerpo de captura, y que, una vez que se aplica la muestra, retiene en la fase sólida al antígeno. Un segundo anticuerpo específico contra un epítipo diferente de la proteína es usado para la detección. De este modo, se suprimen los efectos de la matriz del plasma durante la detección, que interfieren sólo en la reacción entre el anticuerpo de captura y el antígeno. Por el momento no existe en el comercio un kit de ELISA para la detección de sTLR2.

En el presente seminario de título se desarrolló un ELISA de captura para la medición de sTLR2 humano que posteriormente será de utilidad para determinar los niveles de sTLR2 en el plasma de sujetos controles y pacientes con enfermedades asociadas al desbalance de la respuesta inflamatoria⁶. Por otro lado, se propuso la estrategia para desarrollar una proteína recombinante de TLR2, requerida para la cuantificación del ensayo.

⁵Enzyme linked immunosorbent assay

⁶Colitis Ulcerosa, enfermedad de Crohn, Asma.

1.6. Objetivos

Objetivo general Establecer las condiciones óptimas de un ELISA de captura para identificar sTLR2 humano.

Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones necesarias para la medición de sTLR2 en plasma por ELISA de captura:
 - a) Seleccionar los anticuerpos, sistema de detección y proteína de bloqueo para ELISA de captura, que permitan una medición con baja inespecificidad.
 - b) Seleccionar una proteína recombinante de TLR2 que sirva para la confección de una curva estándar.
 - c) Determinar las concentraciones de anticuerpos que permitan desarrollar las condiciones para medir la proteína sTLR2.

2. Diseñar herramientas para el desarrollo de una proteína recombinante de TLR2:
 - a) Comprobar si el plasmidio pFLAG-CMV-1-TLR2 contiene inserto de 2,3kb a través de ensayo de restricción.
 - b) Comprobar si el inserto codifica para TLR2 humano a través de secuenciación y análisis bioinformático.
 - c) Amplificar la secuencia codificante de TLR2 y agregarle sitios de restricción para su inserción en el vector de expresión pEF-21 α (+).

2. Materiales y Métodos

2.1. ELISA de captura

Placas, anticuerpos, proteínas y reactivos. En todos los ensayos se utilizaron placas Nunc® Inmunosorp, de fondo tipo F (Plano) MaxiSorp®, de 96 pocillos. Para los ELISAs de captura se usaron como anticuerpos de captura anti-TLR2 eBioscience™ clon TL2.1 #14-9922 y R&D Systems, Inc. #AF2616, y como anticuerpo de detección R&D Systems, Inc. #BAF2616. Se usó BSA fracción V de Winkler Ltda. El sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y la enzima estreptavidina-HRP (Str-HRP) fue de SIGMA® (T 2885, S2438). Proteína recombinante de TLR2 humano (rTLR2) fue de R&D Systems, Inc. #2616-TR.

Tampones y Soluciones.

Tampón PBS: NaH₂PO₄ 0,02M, Na₂HPO₄ 0,08M, NaCl 1,5M, pH 7,4.

Tampón carbonato: Na₂CO₃ 0,1M, NaHCO₃ 0,1M pH 9,2.

Solución de lavado: PBS con Tween® al 0,05 % v/v.

Solución de bloqueo: PBS con BSA al 1 % p/v, o con proteína de soya al 0,5 % p/v

Tampón citrato-fosfato: NaH₂PO₄ 0,1M, Na₃C₆H₅O₇ 0,05M, pH 5,0.

Sustrato de HRP: 10 % v/v de DMSO, 0,01 % p/v de TMB, 0,006 % v/v de H₂O₂ en tampón citrato-fosfato.

Protocolo general. La Figura 2 muestra el orden utilizado de los anticuerpos, antígeno y la enzima en este tipo de ensayo.

En primer lugar, el anticuerpo de captura anti-TLR2 es diluido entre 1,75 y 5 µg/mL⁷ en tampón carbonato. Enseguida, 100 µL de esta dilución son aplicados por pocillo ON a 4°C para adsorber el anticuerpo de captura al pocillo. A continuación se realizan 2 lavados (para cada lavado se utilizó 400 µL por pocillo de solución de lavado, con agitación por 30 segundos) y se agregan 200 µL de solución de bloqueo por 2 horas a 37°C. Siguiendo, se lava 3 veces y se agregan 100 µL de muestra o rTLR2 en solución de bloqueo

⁷Las concentraciones de los anticuerpos usadas se informan en Sección 3, Resultados.

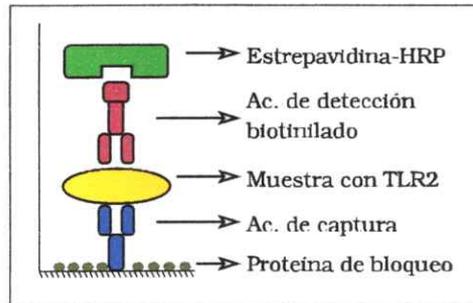


Figura 2: **Diagrama del ELISA de captura.**

Se esquematiza el orden de los elementos del ensayo. Al fondo del posillo se adsorbe el anticuerpo de captura (azul) y la proteína de bloqueo (café). El analito (amarillo) queda unido al anticuerpo de captura, y une al anticuerpo de detección biotinilado (rojo). Finalmente, la enzima estreptavidina-HRP (verde) se une al anticuerpo de detección.

por 2 horas a 37°C. Continuando, se lava 4 veces y se adiciona el anticuerpo policlonal contra TLR2 conjugado con biotina (#BAF2616) diluido entre 10 y 250 ng/mL en 100 μ L de solución de bloqueo por 1 hora a 37°C. Se lava 4 veces y se agrega Str-HRP, dilución 1:200, en 100 μ L de solución de bloqueo, por 40 minutos a 37°C. Finalmente se lava 5 veces y se aplica 100 μ L de sustrato de HRP. La reacción se detiene a los 45 minutos con 50 μ L de H₂SO₄ 2N, y se registra la densidad óptica (OD) a 450 nm, con referencia a 550 nm en equipo Bio-Rad modelo 3550 microplate reader.

Obtención de muestras. Sangre de sujetos normales fue colectada en tubos de colección de 6,0 mL al vacío con EDTA (BD VACUTAINER® K2 EDTA 10,8 mg). Se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 5000 rpm, y se recuperó el plasma desde el sobrenadante. Para el almacenamiento los plasmas fueron refrigerados a -20°C hasta su utilización.

2.2. Avance en el desarrollo de TLR2 recombinante

Análisis de secuenciación. El plasmidio pFLAG-CMV-1-TLR2⁸ fue enviado a Macrogen Inc. para secuenciación parcial con partidor universal para CMV. Para el alineamiento de secuencias se utilizó el programa CLUSTALW del European Bioinformatics Institute⁹.

⁸Donado por Dr. Mantovani [WANG Y COL. 2001].

⁹<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

Etapa	función	temperatura (°C)	tiempo (s)
1	denaturación	96	120
2	denaturación	95	20 c
3	primación	64	20 c
4	elongación	72	50 c
5	elongación	72	300

Cuadro 1: Detalle de la reacción de PCR para hTLR2.

En el campo "tiempo", se ha indicado con una "c" aquellas etapas que constituyen el ciclo. Además se incluye una etapa inicial de denaturación, y una final de elongación.

Análisis de restricción. La digestión doble fue realizada con *Bam*HI, *Not*I y tampón 3 de New England Biolabs® (#R0136S, #R0189S, #B7003S). El plasmidio pFLAG-CMV-1-TLR2 se incubó simultáneamente con ambas enzimas a 37°C por 1 hora, seguido de 10 minutos a 65°C. Los fragmentos fueron resueltos en gel de agarosa al 1%, en tampón TAE (Tris base 0,04M, ácido acético 0,02M, Na₂EDTA 1mM pH 8,0), junto con 250 ng de estándar de DNA de 1kb Winkler Ltda. #BM-1090.

Diseño de partidores y PCR. Para el diseño de partidores se utilizó el programa Primer3Plus [UNTERGASSER Y COL., 2007]¹⁰, usando la interfaz "Cloning". Como secuencia objetivo, se usó la secuencia consenso para TLR2 humano, n° de acceso ab445624, limitada a la región codificante desde el aminoácido lisina 19 hasta arginina 587, o hasta el aminoácido C-terminal. Los partidores entregados por el programa fueron modificados para anexar los sitios de restricción *Bam*HI en el partidor sentido y *Not*I en los partidores antisentido; también se agregaron bases irrelevantes para permitir el corte por la enzima de restricción.

Como DNA polimerasa se utilizó Pfu de Stratagene #600670. Se fijó en 30 ciclos la reacción, el detalle se muestra en la Tabla 1. Para la purificación de los productos de PCR se usó kit de purificación desde gel ©QIAGEN #28704, usando el protocolo recomendado por el fabricante para la extracción con microcentrífuga.

¹⁰<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

3. Resultados

3.1. Tampón de sensibilización, proteína de bloqueo y sistema de detección

En el ELISA de captura, la proteína es retenida desde la muestra líquida en la fase sólida por el anticuerpo de captura. Continuando, se aplica el sistema de detección con el fin de medir la cantidad de proteína retenida. El ELISA de captura para sTLR2, fue adaptado a partir de un protocolo comercial para la medición de citoquinas¹¹. Como anticuerpo de captura, se seleccionó #AF2616, anticuerpo policlonal de cabra contra la porción extracelular de TLR2. Como sistema de detección se empleó el anticuerpo de detección policlonal conjugado con biotina #BAF2616, que fue preparado en la misma especie y contra el mismo antígeno que el anticuerpo de captura, y Str-HRP que a su vez une a la biotina presente en el anticuerpo de detección.

En el inicio de los ensayos de ELISA no se contaba con la proteína recombinante de TLR2, lo que obligó a seleccionar muestras biológicas que contienen sTLR2. La muestra utilizada fue plasma, puesto que, tanto por ELISA de captura como por western blot, se ha demostrado la presencia de sTLR2 en este tipo de muestras [HEGGELUND Y COL. 2004; UELAND Y COL. 2006; LEBOUDER Y COL. 2003]. Se observó con anterioridad que algunas muestras de plasma producen mayor inespecificidad en ensayos control sin anticuerpo, por lo que solamente se utilizó plasma de un único sujeto, normal.

Como punto de partida se utilizaron dos soluciones de bloqueo alternativas, PBS-BSA 1% o PBS-Soya 0,5%, para evaluar su influencia en la OD de fondo. Se probó la sensibilización a pH 7,2 en tampón PBS o a pH 9,4 en tampón carbonato, pues el tampón de sensibilización puede tener efecto en la cantidad de anticuerpo adsorbido, como en su funcionalidad¹².

Se observaron bajas ODs para las muestras independientemente de los tampones de sensibilización y de bloqueo ensayados (Figura 3). Ambas soluciones de bloqueo son efectivas, sin embargo, el bloqueo con PBS-BSA 1% amplía la diferencia entre controles negativos y muestra. Se seleccionó el tampón carbonato para las sensibilizaciones

¹¹http://www.bdbiosciences.com/pharming/en/protocols/Cytokine_ELISA.shtml

¹²Durante el proceso de adsorción, las proteínas deben adquirir una conformación que exponga los grupos polares o hidrofóbicos que la anclarán al pocillo; sin embargo, la conformación adoptada en la fase sólida puede alterar la capacidad de la proteína de unir al antígeno.

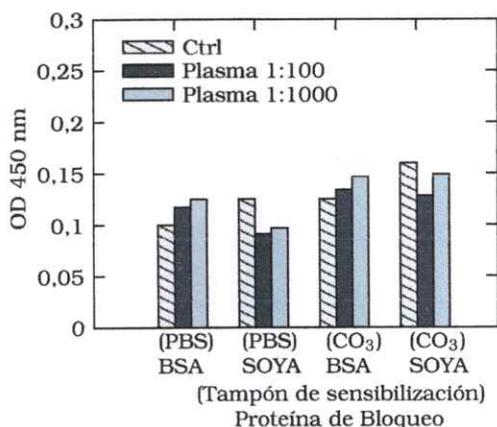


Figura 3: Efecto de solución de bloqueo y tampón de sensibilización

En el gráfico se muestra la OD obtenida a partir de ELISA, con el anticuerpo de captura #AF2616 usando concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para diluciones de muestras de plasma 1:100 (■), 1:1000 (□) y control sin plasma (▨) (resultados de 1 experimento). Se utilizó el anticuerpo de detección a una concentración de 50 ng/mL . Se probaron los tampones de sensibilización PBS y Carbonato, y las soluciones de bloqueo PBS-BSA 1% y PBS-Soya 0,5%. El uso de PBS-BSA 1% como solución de bloqueo muestra diferencias entre controles negativos y muestras (PBS BSA, CO₃ BSA) en contraste al uso de PBS-Soya 0,5% (PBS SOYA, CO₃ SOYA) que no muestra diferencias.

posteriores, por haber producido ODs sutilmente mayores.

Para descartar problemas en el sistema de detección, esto es anticuerpo de detección, Str-HRP y sustrato, se ensayó por separado la funcionalidad de cada elemento. Primero se comprobó la capacidad enzimática de Str-HRP en la reacción colorimétrica final del ensayo (Figura 4a). Enseguida se evaluó la capacidad del anticuerpo de detección de unir Str-HRP (Figura 4b). Las pruebas mostraron que el sistema de detección es funcional.

Continuando se evaluó la capacidad del anticuerpo de detección de unir sTLR2 en la muestra. Para estudiar la posible interferencia de los componentes del plasma en la unión del anticuerpo de detección y a falta de un control positivo de sTLR2, se sensibilizó la placa con diferentes diluciones de muestra de plasma, tal como se haría en un ELISA directo. Después de bloquear la placa, se continuó aplicando el sistema de detección.

En contraste a lo observado anteriormente en los ensayos de funcionalidad del sistema de detección, las muestras de plasma mostraron ODs menores a 0,3 (Figura 5). Esto explica las ODs bajas medidas para muestras de plasma en el ELISA de captura preliminar. Además, los blancos sin anticuerpo de detección evidencian que una parte importante de la OD es independiente de la interacción específica antígeno-anticuerpo y corresponde al ruido del ensayo. Todos los blancos tienen OD sobre 0,1 y mantienen la distribución

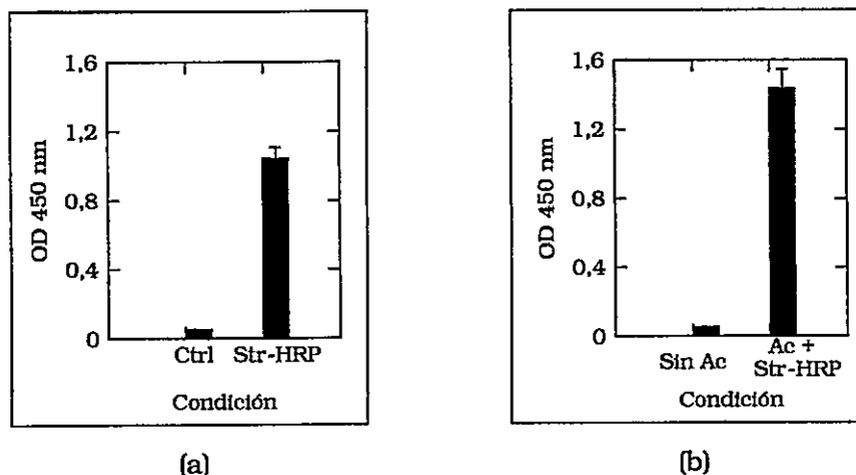


Figura 4: **Funcionalidad del sistema de detección**

En (a) se muestra la OD desarrollada por el sustrato cuando es aplicado en un pocillo sensibilizado con 100 μL de Str-HRP dilución 1:200 (Str-HRP); como control negativo, el pocillo fue tratado con solución de bloqueo por 2 horas a 37°C, previo a la aplicación de Str-HRP (Ctrl). En (b) se muestra la OD del sustrato, tras haber sensibilizado con 100 μL de anticuerpo de detección #BAF2616 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lavado con PBS-Tween®, bloqueado, e incubado con 100 μL de Str-HRP dilución 1:200 (Ac + Str-HRP); como control negativo, la sensibilización se hizo sólo con PBS (Sin Ac). Los resultados corresponden a promedios de duplicados \pm desviación estandar.

observada en los experimentos con el anticuerpo. Un máximo de señal se obtuvo para diluciones intermedias de plasma en el rango 1:1000-1:5000.

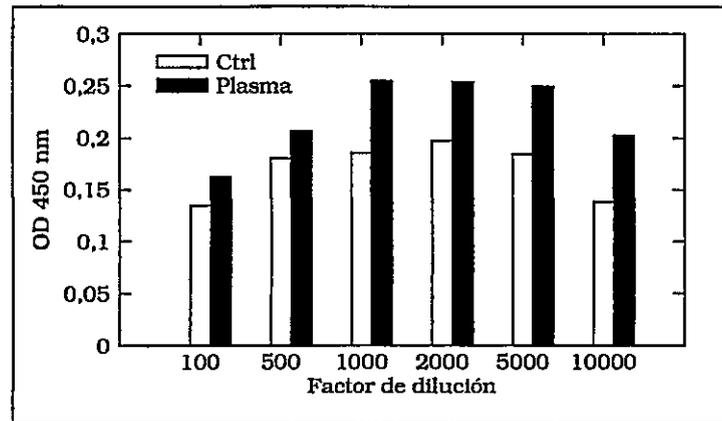


Figura 5: Máxima señal de OD en ELISA directo a diluciones intermedias de plasma
 En el gráfico se muestra la OD obtenida a partir de ELISA directo sensibilizando con 100 μ L de diferentes diluciones de plasma desde 1:100 a 1:10000 (■)(resultados de 1 experimento). Se utilizó el anticuerpo de detección a una concentración de 50 ng/mL. Como control negativo se utilizaron las mismas diluciones de plasma, sin agregar anticuerpo de detección (□). Se observa un máximo de señal entre las diluciones 1:1000 y 1:5000, alrededor de 0,05 restando sus respectivos blancos sin anticuerpo de detección.

3.1.1. Pruebas con anticuerpo de captura monoclonal y rTLR2

Las interacciones inespecíficas que resultan entre el plasma y el sistema de detección no permiten tener un ensayo de ELISA directo confiable. Para subsanar este problema se escogió para la captura de la proteína un anticuerpo monoclonal contra la porción extracelular de TLR2, clon TL2.1. Este anticuerpo ha sido utilizado previamente para la medición de sTLR2 por ELISA de captura en plasma, aún cuando no se ha demostrado que sea capaz de unir todas las formas de sTLR2 [UELAND Y COL. 2006].

Para estimar la cantidad de TLR2 que podría ser detectada, se utilizó la proteína recombinante de TLR2 #2616-TR (rTLR2) de R&D Systems. Una curva estándar desde 80 ng/mL a 320 ng/mL de la proteína fue ensayada utilizando diferentes diluciones tanto de anticuerpo de captura como de detección (Figura 6).

El rango de ODs oscila entre 0,6 y 1,4 para la mayor concentración de anticuerpos, y disminuye al usar mayores diluciones de anticuerpos. Esta disminución en la OD es más marcada al diluir el anticuerpo de detección. Para todas las diluciones de anticuerpo de captura y de detección ensayadas, se observa un aumento en la OD proporcional a la concentración de rTLR2. La OD de los experimentos controles, en los cuales no se agrega rTLR2, corresponde a aproximadamente un 30% de la OD obtenida para 160 ng/mL de

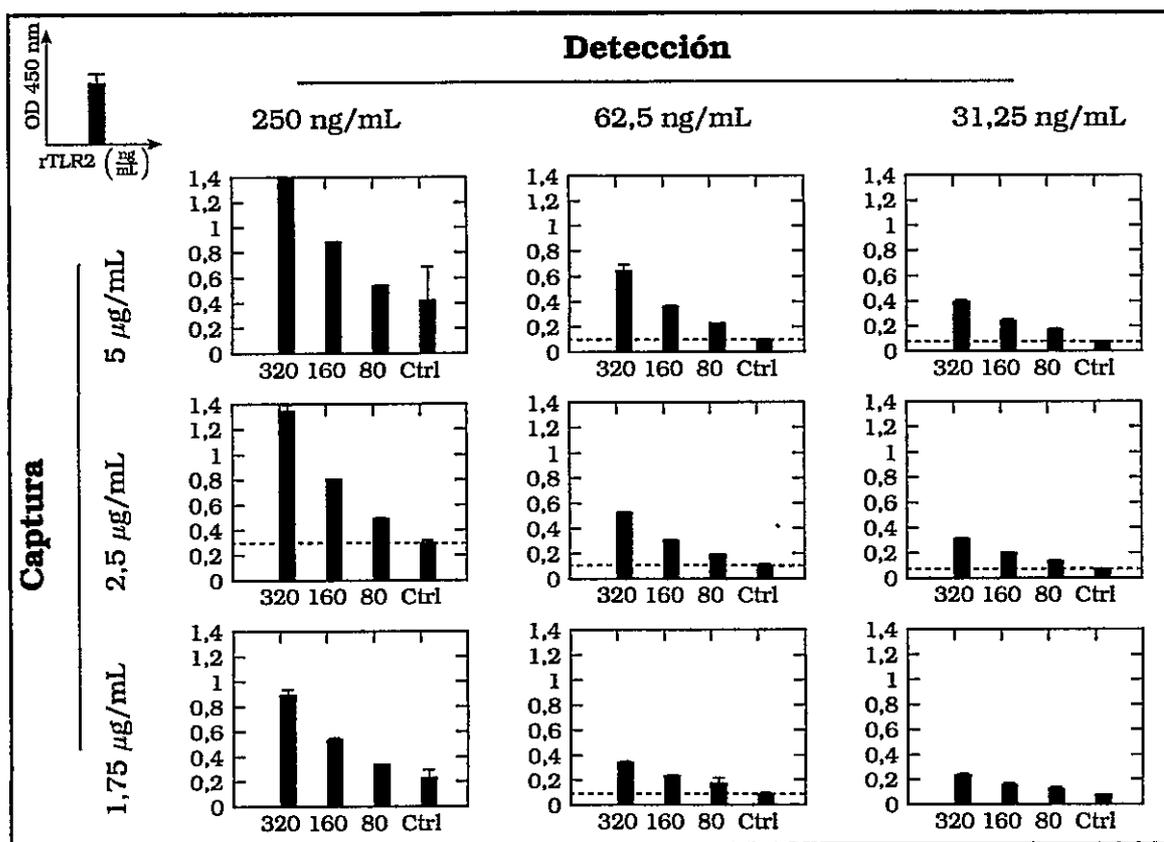


Figura 6: Curva estándar de rTLR2 en ELISA de captura con monoclonal, clon TL2.1
 En cada gráfico de barras se presentan las ODs obtenidas por ELISA de captura para tres concentraciones de rTLR2 (320-80 ng/mL) y el control correspondiente al ensayo sin proteína recombinante (Ctrl), como promedio de duplicados \pm desviación estándar. Los gráficos representan de izquierda a derecha tres concentraciones del anticuerpo de detección (250 ng/mL, 62,5 ng/mL, 31,25 ng/mL); de arriba a abajo, tres concentraciones del anticuerpo monoclonal de captura (5 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 1,75 μ g/mL). Se ha trazado con línea punteada el nivel del experimento control, en todos los casos en que dicho control representa alrededor de un tercio de la OD del punto medio de la curva (160 ng/mL).

rTLR2. La OD de estos controles podría deberse a una interacción inespecífica entre los anticuerpos de captura y detección.

Con el objeto de conocer la intensidad de la posible interacción entre el anticuerpo de detección y el anticuerpo de captura observada en los controles del experimento anterior, respecto de la unión al antígeno, la placa se sensibilizó alternativamente con 100 μ g de anticuerpo de captura o de rTLR2, y después de bloquear, se aplicó el sistema de detección. Como se aprecia en los resultados de esta prueba, (Figura 7) la interacción observada entre el par de anticuerpos es mucho más débil que la unión entre el anticuerpo de

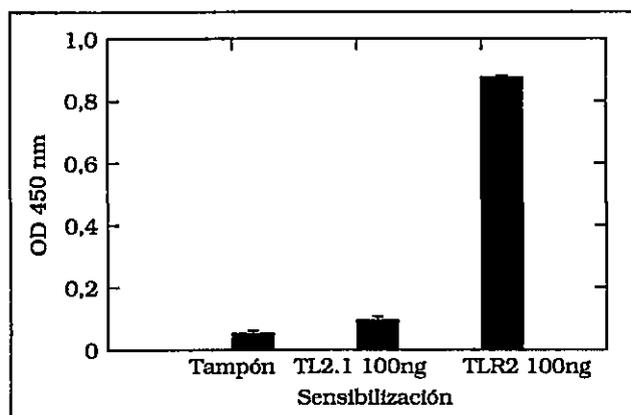


Figura 7: Interacción entre anticuerpos es débil frente a la unión a rTLR2

El gráfico muestra las ODs obtenidas tras sensibilizar con 100 ng de anticuerpo de captura (TL2.1) o 100 ng de rTLR2 (TLR2), y aplicar el sistema de detección, con el anticuerpo de detección a 50 ng/mL; "Tampón" corresponde a la condición sin proteína en la etapa de sensibilización. Los resultados corresponden a promedios de triplicados \pm desviación estándar.

detección y rTLR2. Por consiguiente, la dilución del anticuerpo de detección podría ampliar la diferencia en la OD del control y la curva.

En busca de una mayor diferencia entre la OD de la condición control y la curva estándar, se probaron menores concentraciones del anticuerpo de detección (ver discusión en Sección 4, Figura 12). Si bien la mayor dilución del anticuerpo de detección logra disminuir la unión inespecífica, también disminuye la señal de la curva estándar con rTLR2 (Figura 8).

Con estos resultados, se seleccionaron las concentraciones de anticuerpo a utilizar. La concentración del anticuerpo de captura se fijó en 5 μ g/mL, y la del anticuerpo de detección en 62,5 ng/mL, de manera de lograr para la curva estándar la mayor OD posible manteniendo la OD del control sin rTLR2 por debajo de 0,1. Con esta configuración se decidió aplicar el ELISA de captura a muestras de plasma.

Para evaluar la capacidad del ensayo de identificar rTLR2 en la misma matriz de las muestras, se agregó al plasma rTLR2 a una concentración final de 200 o 400 ng/mL de la proteína recombinante. Como se muestra en Figura 9, el ensayo es capaz de medir desde 20 ng/mL de rTLR2 y conserva proporcionalidad entre OD y concentración al menos hasta 320 ng/mL (curva estándar). Sin embargo en plasma se observa una disminución alrededor de un 45% en la OD de rTLR2, lo que implica que la matriz del plasma interfiere significativamente con el ensayo. El plasma presenta una OD corregida inferior a 0,07

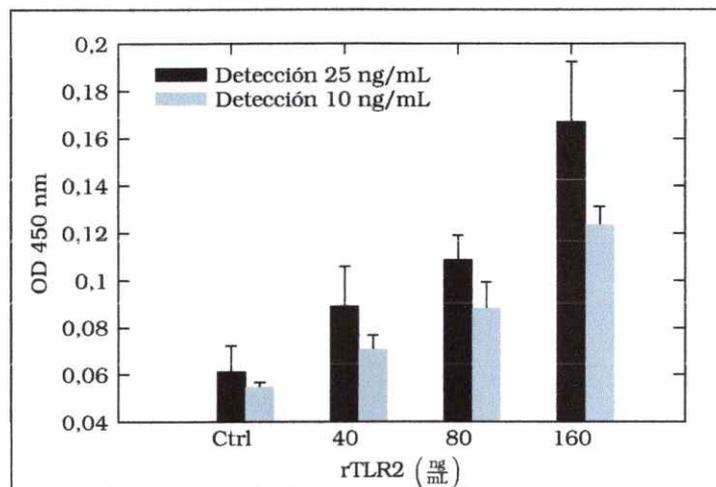


Figura 8: Dilución del anticuerpo de detección disminuye la OD inespecífica

El gráfico muestra las ODs de la curva estándar con rTLR2 (40-160 ng/mL) del ELISA de captura, usando anticuerpo de captura en 5 µg/mL y para dos concentraciones del anticuerpo de detección, 25 ng/mL (■) y 10 ng/mL (■). Para ambas concentraciones de anticuerpo de detección, la señal del control sin rTLR2 (Ctrl) es menor a 0,075, en contraste a lo registrado en el mismo control para mayores concentraciones del anticuerpo de detección (Figura 6). Los resultados corresponden a promedios de duplicados ± desviación estándar.

tanto en presencia como en ausencia del anticuerpo de captura. Al adicionarle rTLR2 (200 ng/mL) al plasma, la OD corregida aumenta hasta 0,13, mientras que en el experimento sin anticuerpo de captura, el aumento es sólo hasta 0,07.

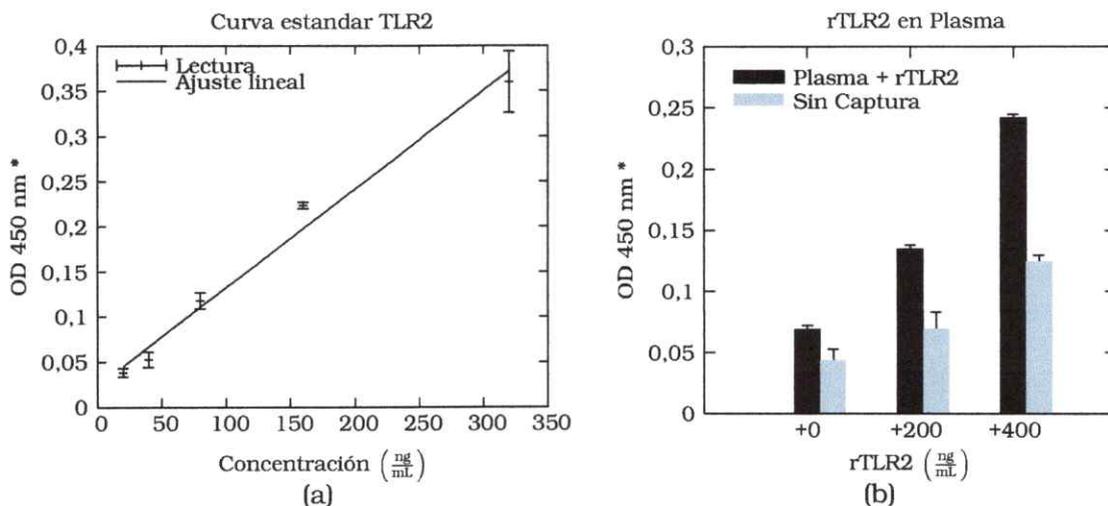


Figura 9: Detección de rTLR2 en plasma

ELISA de captura, usando dilución 1:800 (62,5 ng/mL) de anticuerpo de detección y anticuerpo de detección en 62,5 ng/mL. Las ODs se han corregido con respecto al control sin plasma ni rTLR2. En (a) se muestra la curva estándar de rTLR2 de 20 a 320 ng/mL. En (b) se muestran las lecturas obtenidas en plasma con 0, 200 o 400 ng/mL de rTLR2 (■); como control, se ha graficado el ensayo sin anticuerpo de captura (□). En ambos gráficos, se muestran los promedios de duplicados \pm desviación estándar.

3.2. Avance en el desarrollo de TLR2 recombinante

Hasta el momento, ha sido de gran utilidad para los ensayos la proteína recombinante de TLR2 #2616-TR de R&D Systems. Para poder contar con una proteína recombinante de TLR2 humano producida en el laboratorio, se realizó la caracterización de la secuencia codificante de TLR2 humano, presente en el plasmidio pFLAG-CMV-TLR2.

Los resultados se muestran a continuación.

Secuencia codificante de TLR2. El plasmidio pFLAG-CMV-TLR2 contiene la secuencia codificante de TLR2 humano. La disposición de la secuencia codificante de TLR2 se confirmó a través de secuenciación con el partidor universal de CMV (Figura 10).

De acuerdo al alineamiento con la secuencia consenso de TLR2 humano¹³, el plasmidio pFLAG-CMV-TLR2 posee una secuencia de 2,3 kb que codifica desde el residuo lisina 19 hasta el extremo C-terminal de TLR2, flanqueada por un sitio de restricción *NotI* en el extremo 5', y un sitio *BamHI* en el 3'.

¹³nº de acceso ab445624.

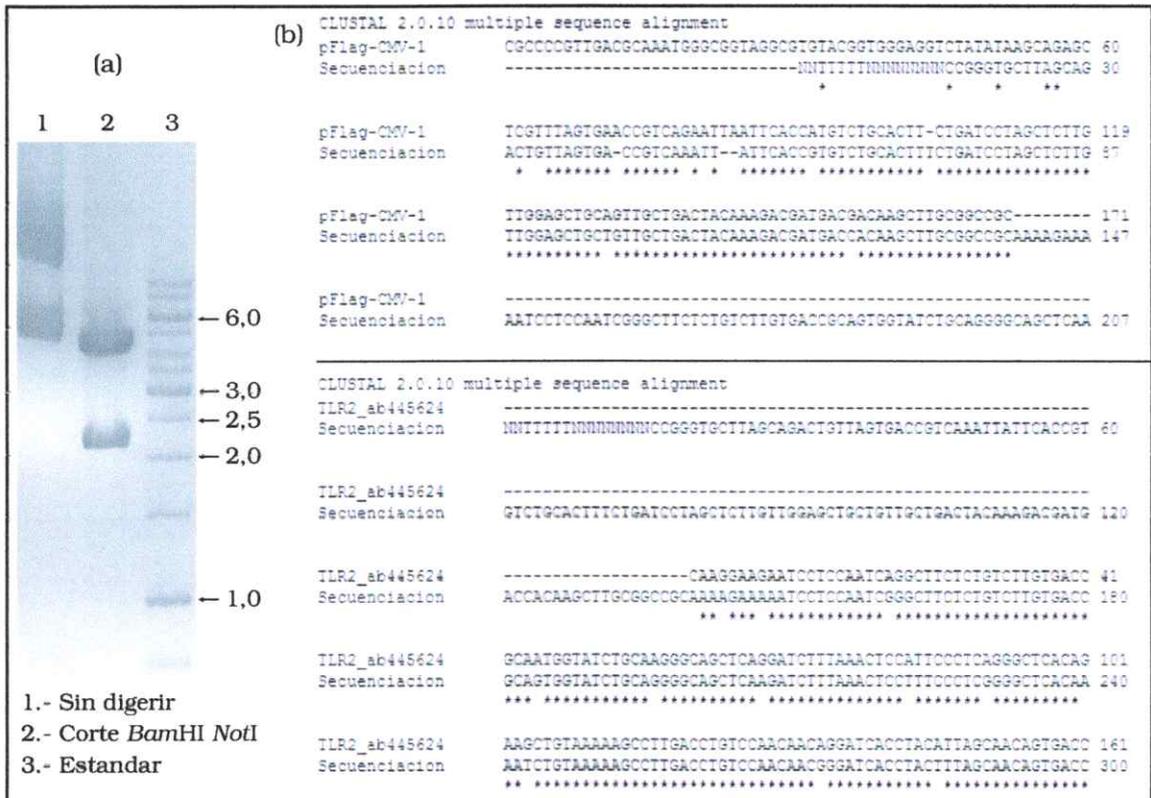


Figura 10: **Análisis del plasmidio pFLAG-CMV-TLR2**

En (a) gel de agarosa 1 % para resolver el plasmidio pFLAG-CMV-TLR2 (carril 1) y su digestión con *Bam*HI y *Not*I, que liberan el inserto de 2,3 kb (carril 2); se cargó el estándar de peso molecular de 1kb (carril 3), y se anotaron los tamaños de las bandas en kb. En (b) el resultado de la secuenciación (Secuenciación) se alineó con la secuencia del plasmidio vacío (pFLAG-CMV-1) indicada por el fabricante, entre el promotor CMV y el sitio *Not*I (arriba) y con la secuencia consenso de TLR2 con n° de acceso ab445624 (TLR2_ab445624), entre las bases codificantes para el aminoácido lisina 19 y alanina 54 (abajo).

PCR para TLR2. Para conseguir la proteína recombinante es necesario utilizar un vector de expresión bacteriano. Con el objeto de incluir la secuencia codificante de TLR2 en dicho vector, se diseñaron partidores PCR para añadir por PCR al inserto, los sitios de restricción 5' *Bam*HI y 3' *Not*I, adecuados para el subclonamiento. Como vector de expresión, se seleccionó el plasmidio pET-21α(+) de Novagen® donado por el Dr. Oscar León¹⁴. Este vector contiene el promotor T7 río arriba del sitio de multiclonamiento, y río abajo de éste, tiene un región que codifica para un tag de histidinas¹⁵ (Figura 11a). Se diseñaron tres partidores con sitios de restricción para subclonar TLR2. Un partidor sentido común (Fwd_ BamHI_TLR2), y 2 antisentido alternativos para amplificar la secuencia codificante de la parte extracelular de TLR2 (R_eTLR2_NotI), o la secuencia completa (R_cTLR2_NotI). A continuación se muestran sus secuencias de 5' a 3'. Las bases en *itálicas* hibridan con TLR2, mientras que en **negrita** está el sitio de restricción *Bam*HI en el caso del partidor sentido, y *Not*I en el caso del antisentido.

- Fwd_ BamHI_TLR2: GGCG**GGATCC**GAAGAATCCTCCAATC
- R_eTLR2_NotI: TAATG**CGGCCG**CCCTGTGACATTCCG
- R_cTLR2_NotI: ATTAG**CGGCCG**GGACTTTATCGCAG

¹⁴Departamento de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

¹⁵His-Tag®: Cola de 6 histidinas en el C-terminal útil para la purificación de la proteína por columna de Ni.

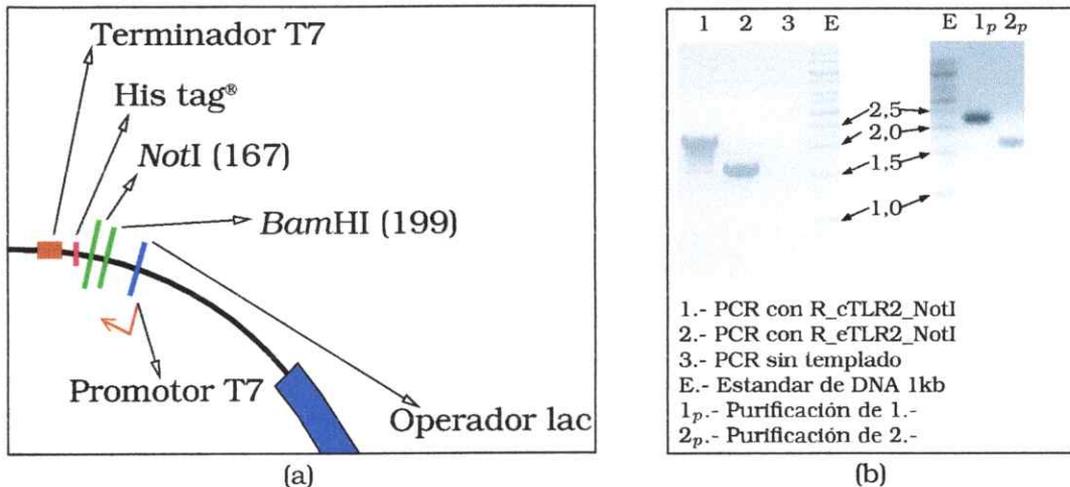


Figura 11: Amplificación por PCR de secuencia de TLR2

En (a) se muestra un esquema del sitio de multiclonamiento del vector pET-21a(+). En el sentido transcripcional del promotor T7 (T7 promoter) se ubica primero el sitio de restricción *Bam*HI, seguido de *Not*I, y de la secuencia codificante para la cola de histidinas (His tag). La transcripción está normalmente reprimida por el operador lac (lac operator). En (b) se muestra el producto de PCR utilizando los partidores diseñados para la secuencia completa de TLR2 (1), y para la porción que codifica para el dominio extracelular (2). Se muestra además la purificación con columna de los productos de PCR (1_p, 2_p) y la reacción sin templado (3); se compara contra estándar de DNA de 1kb (E). Los productos de amplificación poseen los tamaños esperados de 2,3 y 1,7 kb.

Los partidores adicionan sitios de restricción que mantienen el marco de lectura adecuado para la expresión de TLR2 y el tag de histidinas en pET-21a(+). En la Figura 11b se observa como resultado del PCR, los fragmentos esperados de 2,3kb para la amplificación del inserto codificante para TLR2 completo, y de 1,7 kb, correspondiente al amplificado de la región extracelular. Los productos de PCR fueron purificados desde gel, para continuar con su digestión y ligación al vector pET-21a(+)

Hasta la fecha no se ha conseguido ligar el amplificado de PCR con el plasmidio de expresión. Una vez conseguida la inserción en el vector pET-21a(+), resta incluir dicho vector en bacteria mediante transformación. Continuando, la expresión en bacteria de TLR2 debe ser inducida con IPTG y finalmente, TLR2, tiene que ser purificado en columna de Ni, por medio del tag de histidinas que contiene.

4. Discusión

Sólo en los últimos 10 años, tras la descripción del primer homólogo de la proteína Toll de *Drosophila* en humanos, se ha descubierto la capacidad de los TLRs de unir moléculas microbianas, y se ha demostrado la íntima relación de estos receptores con la inmunidad innata, y el desarrollo de la inflamación [O'NEILL, 2004]. Durante éste período se ha descubierto una red creciente de componentes que participan de las cascadas de señalización de éstos receptores, y también se han descrito algunos inhibidores endógenos de los TLRs [KAWAI Y AKIRA, 2006].

En la actualidad, se ha explorado la relación entre los TLRs y el desarrollo de patologías de carácter inflamatorio o autoinmune, con importantes descubrimientos en el área clínica. Es el caso de TLR4, involucrado en la progresión de la artritis reumatoide: El uso de un antagonista de TLR4 disminuye sustancialmente las manifestaciones clínicas e histológicas de la artritis en modelos murinos de artritis espontánea e inducida [ABDOLLAHI-ROODSAZ Y COL. 2007]. De manera similar, el inhibidor dual de TLR7/9, IRS954, desarrollado por Dynavax Technologies, disminuye los síntomas y la progresión de la enfermedad en modelo murino de Lupus [BARRAT Y COL. 2007]. Estos estudios han motivado esfuerzos para el desarrollo de nuevos inhibidores de los TLRs y su señalización, y han puesto de manifiesto la importancia de los posibles mecanismos endógenos de regulación negativa de éstas vías, entre los que se encuentran la producción de sTLRs.

Hasta la fecha no se ha demostrado la participación de la formas solubles de los TLRs en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, tampoco han sido utilizadas con fines terapéuticos. Sin embargo, sTLR2 disminuye *in vitro* la producción de citoquinas pro-inflamatorias, ya sea con el uso de una proteína recombinante de sTLR2, o con la aplicación de los fluidos biológicos que contienen sTLR2: plasma, saliva y líquido amniótico [LEBOUDER Y COL. 2003; KUROISHI Y COL. 2007; DULAY Y COL. 2007].

La medición de sTLR2 en el plasma se ve dificultada por la complejidad de este fluido. El plasma contiene una mezcla abundante de proteínas, carbohidratos, y lípidos. Algunos de estos componentes¹⁶ son fuente de interferencia para los inmuno-ensayos, ya sea enmascarando la cantidad real del analito o sobrevalorándola. Por otra parte existen diferencias en varios órdenes de magnitud entre las proteínas más abundantes, como

¹⁶Fibrinógeno, proteínas del complemento, factor reumatoide, autoanticuerpos, entre otros [WOOD, 1991].

la albúmina, y otras de menor abundancia como las citoquinas [GRANGER Y COL. 2005] y las concentraciones de la mayoría de las proteínas plasmáticas son extremadamente variables de un individuo a otro [SELBY, 1999]. Así, las proteínas de mayor abundancia suelen entorpecer la medición las de menor abundancia.

4.1. ELISA de captura para TLR2

En el presente seminario de título se ha mostrado la estandarización de un ELISA de captura con un rango lineal entre 20 y 320 ng/mL de rTLR2.

Sin embargo, se ha mostrado que la matriz del plasma es capaz de interferir con la medición (Figura 9) disminuyendo la OD de rTLR2 en un 45%.

En consecuencia, las formas de sTLR2 endógenas no han sido detectadas aún, pese a que la concentración plasmática reportada para sTLR2 en individuos normales es alrededor de 50 ng/mL [UELAND Y COL. 2006], que se encuentra dentro de la curva estándar con rTLR2. Es probable que las muestras de plasma necesiten algún procesamiento previo para disminuir las interferencias de la matriz en el ensayo.

Unión inespecífica entre los componentes del ensayo. Durante la estandarización del protocolo, se observó interacción inespecífica entre el anticuerpo monoclonal de captura, clon TL2.1 #14-9922 y el anticuerpo policlonal de detección #BAF2616. Dicha interacción podría ocurrir por la presencia de inmunoglobulinas reactivas contra el anticuerpo monoclonal en el suero policlonal.

De acuerdo al supuesto esquematizado en la Figura 12, al usar mayores diluciones del anticuerpo policlonal de detección, decrece la cantidad de anticuerpos que se unen a la fase sólida, tanto aquellos que se unen específicamente como los que lo hacen de manera inespecífica, tal como se ha observado en los experimentos, Figura 6 y Figura 8. Sin embargo, diferencias entre las afinidades de las inmunoglobulinas policlonales permitirían obtener una mayor señal de rTLR2 frente al control sin proteína recombinante a una dilución determinada del anticuerpo policlonal. En efecto estas diferencias en afinidades quedan en evidencia en el experimento sintetizado en la Figura 7, en el que se prueba el sistema de detección contra iguales cantidades de rTLR2 o de anticuerpo de captura.

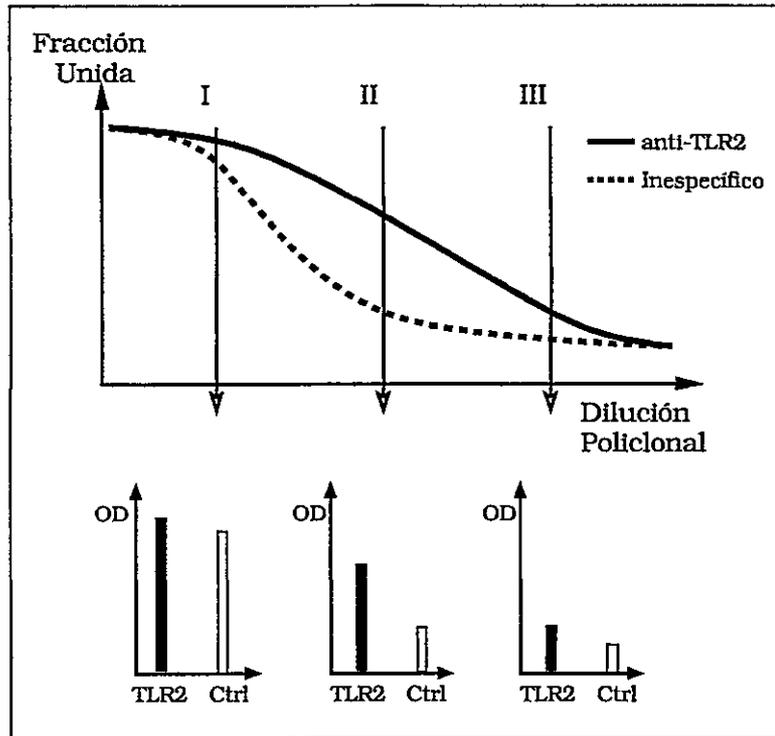


Figura 12: Curva teórica de unión específica V/S no específica del anticuerpo policlonal

Las curvas en el gráfico superior ilustran la fracción del anticuerpo de detección que se ancla a la fase sólida durante el ELISA de captura, de acuerdo con la dilución de este anticuerpo. Se postula que dentro del conjunto de anticuerpos, aquellos que se unen a TLR2 tienen mayor afinidad (—) que los que se unen a otros elementos del ensayo (.....). De acuerdo con esto, abajo se ilustra lo que resultaría del ELISA de captura al utilizar 3 diluciones diferentes de anticuerpo de detección, en un experimento con TLR2 (TLR2), o sólo con el vehículo (Ctrl). En I y en III las formas de las curvas disminuyen las diferencias entre ambos experimentos; una dilución intermedia del anticuerpo de detección (II) permite el aumento en la diferencia entre el experimento con TLR2 y el control.

Las pruebas con mayores diluciones del anticuerpo de detección en Figura 8 (25 ng/mL, 10 ng/mL) concuerdan con la situación III del supuesto, donde la señal de la curva estándar se acerca a la del control. Lo mismo sucede en Figura 6 al usar el anticuerpo de detección más concentrado (250 ng/mL), esta vez concordando con la situación I. Por esta razón, para el ensayo se seleccionó una concentración intermedia (situación II) de anticuerpo de captura, 62,5 ng/mL, que optimiza la sensibilidad del ensayo. Además se logra mantener el control con OD bajo 0,1.

Por último, se mostró que la aplicación de rTLR2 al plasma tras bloqueo del pocillo, aumenta la OD desarrollada por el sistema de detección sin la participación del anticuerpo de captura (Figura 9b, "Sin Captura"). Es posible que los antígenos en el plasma sean

capaces de quedar fijados al pocillo aún con la proteína bloqueante, lo que explicaría el aumento en la OD de los controles sin anticuerpo de captura al agregar rTLR2 (Figura 9).

Importancia de rTLR2 como control positivo. El principal inconveniente en el análisis de los resultados de la Subsección 3.1 Pruebas con el sistema de detección, fue la ausencia de un control positivo para la evaluación del ensayo. Para la elección del anticuerpo de detección, así como el tampón de sensibilización y la solución de bloqueo, el principal criterio fue el de conseguir un diseño con baja señal de fondo (controles negativos). Con el uso de la proteína recombinante de TLR2 los experimentos apuntaron hacia maximizar la diferencia entre los controles negativos y las mediciones con rTLR2. También fue posible asegurar que los anticuerpos utilizados en el diseño son capaces de retener al antígeno en la fase sólida, y por último se encontró una relación proporcional entre la cantidad de rTLR2 en la muestra y la lectura de OD.

4.2. Estrategia para el desarrollo de TLR2 recombinante

Se ha comprobado la presencia del inserto codificante para TLR2 en el plasmidio pFLAG-CMV-TLR2, y se ha estandarizado el PCR necesario para agregar, a este inserto, los sitios de restricción necesarios para insertarlo en un vector de expresión bacteriano. Usando la misma amplificación por PCR, con otro partidador reverso, se consiguió agregar sitios de restricción a una segunda secuencia codificante de TLR2, que va desde el aminoácido lisina 19 hasta arginina 587, y que corresponde a la región extracelular de la proteína.

Las secuencias para amplificar son inusualmente grandes (1,7 y 2,3 kb), por lo que fue necesario utilizar una enzima de alta fidelidad (Pfu) para la reacción de PCR.

Una vez que se incorporen los insertos en el vector de expresión bacteriano, otros desafíos quedan en torno a lograr la expresión de las proteínas, y su purificación. Por último, se debe conseguir que dichas proteínas mantengan los epitopos reconocidos por el par de anticuerpos del ensayo. Pese a estos posibles obstáculos, es necesario desarrollar tecnologías propias que amplían los alcances del desarrollo científico del país.

5. Conclusión

Durante el presente trabajo, se ha logrado la estandarización de un ELISA de captura para rTLR2, con una curva estándar entre los 20 y 320 ng/mL de proteína recombinante. Las determinaciones hechas con este ensayo en plasma, han mostrado una interferencia en la detección de rTLR2, que muestra la necesidad de aplicar un tratamiento previo al plasma para lograr medir sTLR2 endógeno.

También se ha determinado la disposición del inserto codificante para TLR2 en el plásmido pFLAG-CMV-1-TLR2, y se ha diseñado un PCR que permite subclonar tanto la secuencia completa del inserto, como la región codificante para el dominio extracelular de TLR2, en el vector de expresión bacteriano pET-21a(+).

La estandarización del ensayo, es de gran utilidad para esclarecer el posible rol de sTLR2 en el desarrollo de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, y por tanto, para el desarrollo de terapias de nueva generación enfocadas a la actividad de TLR2 en dichas enfermedades.

Referencias

- Abbas, A., A. Lichtman (2003) *Cytokines En Cellular and Molecular Immunology*, 5th ed., capítulo 12 pp, 275-297. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Abdollahi-Roodsaz, S., L. Joosten, M. Roelofs, y col. (2007) Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* **56**(9):2957-67.
- Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. Vabulas, H. Wagner (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**(7):1958-68.
- Akira, S., S. Uematsu, O. Takeuchi (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**(4):783-801.
- Alexopoulou, L., A. Holt, R. Medzhitov, R. Flavell (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**(6857):732-8.
- Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, y col. (2002) Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* **8**(8):878-84.
- Anderson, N., N. Anderson (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **1**(11):845-67.
- Barnes, P., M. Karin (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**(15):1066-71.
- Barrat, F., T. Meeker, J. Chan, C. Guiducci, R. Coffman (2007) Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol* **37**(12):3582-6.
- Bell, J., G. Mullen, C. Leifer, A. Mazzoni, D. Davies, D. Segal (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**(10):528-33.
- Blander, J., R. Medzhitov (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**(5673):1014-8.

- Chen, C., C. Rosenbloom, D. Anderson, A. Manning (1995) Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol* **155**(7):3538–45.
- Chuang, T., R. Ulevitch (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* **11**(3):372–8.
- Chuang, T., R. Ulevitch (2001) Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* **1518**(1-2):157–61.
- Cooper, M., M. Alder (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**(4):815–22.
- Diebold, S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, S. Reis (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**(5663):1529–31.
- Dulay, A., C. Buhimschi, G. Zhao, E. Oliver, A. Mbele, S. Jing, I. Buhimschi (2007) 44: A functional role for the novel soluble toll-like receptor-(STLR2) in modulating intra-amniotic immune responses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **197**(6S):21–21.
- Dunne, A., L. O'Neill (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2003**:171.
- Echchannaoui, H., K. Frei, C. Schnell, S. Leib, W. Zimmerli, R. Landmann (2002) Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* **186**(6):798–806.
- Ehlers, M., J. Riordan (1991) Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* **30**(42):10,065–74.
- Granger, J., J. Siddiqui, S. Copeland, D. Remick (2005) Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* **5**(18):4713–8.

- Groh, V., J. Wu, C. Yee, T. Spies (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**(6908):734–8.
- Haehnel, V., L. Schwarzfischer, M. Fenton, M. Rehli (2002) Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* **168**(11):5629–37.
- Hayashi, F., K. Smith, A. Ozinsky, y col. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**(6832):1099–103.
- Heggelund, L., T. Flo, K. Berg, y col. (2004) Soluble toll-like receptor 2 in HIV infection: association with disease progression. *AIDS* **18**(18):2437–9.
- Hibino, T., M. Loza-Coll, C. Messier, y col. (2006) The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* **300**(1):349–65.
- Hochrein, H., B. Schlatter, M. O’Keeffe, y col. (2004) Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and-independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(31):11.416.
- Hoebe, K., E. Janssen, S. Kim, L. Alexopoulou, R. Flavell, J. Han, B. Beutler (2003) Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* **4**(12):1223–9.
- Iwami, K., T. Matsuguchi, A. Masuda, T. Kikuchi, T. Musikachoen, Y. Yoshikai (2000) Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* **165**(12):6682–6.
- Janssens, S., K. Burns, J. Tschopp, R. Beyaert (2002) Regulation of interleukin-1-and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* **12**(6):467–71.
- Jin, M., S. Kim, J. Heo, y col. (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**(6):1071–82.

- Kamon, H., T. Kawabe, H. Kitamura, y col. (2006) TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J* **25**(17):4108–19.
- Kawai, T., S. Akira (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**(5):816–25.
- Kobayashi, K., L. Hernandez, J. Galán, C. Janeway Jr, R. Medzhitov, R. Flavell (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**(2):191–202.
- Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert, S. Lu (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**(1):45–53.
- Krug, A., A. French, W. Barchet, y col. (2004) TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**(1):107–19.
- Kuroishi, T., Y. Tanaka, A. Sakai, Y. Sugawara, K. Komine, S. Sugawara (2007) Human parotid saliva contains soluble toll-like receptor (TLR) 2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells. *Mol Immunol* **44**(8):1969–76.
- Latz, E., A. Verma, A. Visintin, y col. (2007) Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **8**(7):772–9.
- LeBouder, E., J. Rey-Nores, N. Rushmere, y col. (2003) Soluble forms of Toll-like receptor (TLR) 2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* **171**(12):6680–9.
- Leulier, F., B. Lemaitre (2008) Toll-like receptors—taking an evolutionary approach. *Nature reviews Genetics* **9**(3):165.
- Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, A. Iwasaki (2003) Toll-like Receptor 9-mediated Recognition of Herpes Simplex Virus-2 by Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **198**(3):513.
- Mantovani, A., M. Locati, A. Vecchi, S. Sozzani, P. Allavena (2001) Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* **22**(6):328–36.

- Massague, J. (1990) Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* **265**(35):21.393-6.
- McWhirter, S., K. Fitzgerald, J. Rosains, D. Rowe, D. Golenbock, T. Maniatis (2004) IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci US A* **101**(1):233-8.
- Morr, M., O. Takeuchi, S. Akira, M. Simon, P. Muhlradt (2002) Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol* **32**(12):3337-47.
- Murphy, G., A. Murthy, R. Khokha (2008) Clipping, shedding and RIPping keep immunity on cue. *Trends in Immunology* **29**(2):75-82.
- Nathan, C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature* **420**(6917):846-52.
- O'Neill, L. (2004) TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* **25**(12):687-93.
- O'Neill, L., A. Bowie (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**(5):353-64.
- Plas, D., M. Thomas (1998) Negative regulation of antigen receptor signaling in lymphocytes. *J Mol Med* **76**(8):589-95.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, y col. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**(5396):2085-8.
- Renckens, R., J. Roelofs, S. Florquin, A. de Vos, H. Lijnen, C. van't Veer, T. van der Poll (2006) Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs host defense against abdominal sepsis. *J Immunol* **176**(6):3735-41.
- Rock, F., G. Hardiman, J. Timans, R. Kastelein, J. Bazan (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci US A* **95**(2):588-93.
- Sato, M., H. Suemori, N. Hata, y col. (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity* **13**(4):539-48.

- Schwartz, D., T. Quinn, P. Thorne, S. Sayeed, A. Yi, A. Krieg (1997) CpG Motifs in Bacterial DNA Cause Inflammation in the Lower Respiratory Tract. *The Journal of Clinical Investigation* **100**(1):68-73.
- Selby, C. (1999) Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* **36**(Pt 6):704-21.
- Shultz, L., T. Rajan, D. Greiner (1997) Severe defects in immunity and hematopoiesis caused by SHP-1 protein-tyrosine-phosphatase deficiency. *Trends Biotechnol* **15**(8):302-7.
- Smookler, D., F. Mohammed, Z. Kassiri, G. Duncan, T. Mak, R. Khokha (2006) Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. *J Immunol* **176**(2):721-5.
- Starr, R., D. Metcalf, A. Elefanty, y col. (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci US A* **95**(24):14.395-9.
- Takeda, K., S. Akira (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**(1):1-14.
- Thomassen, E., B. Renshaw, J. Sims (1999) Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine* **11**(6):389-99.
- Ueland, T., T. Espevik, J. Kjekshus, y col. (2006) Mannose binding lectin and soluble Toll-like receptor 2 in heart failure following acute myocardial infarction. *J Card Fail* **12**(8):659-63.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, J. Leunissen (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* **35**(Web Server issue):W71.
- Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, y col. (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* **4**(9):920-7.
- Wang, Q., R. Dziarski, C. Kirschning, M. Muzio, D. Gupta (2001) Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-> MyD88-> IRAK-> TRAF-> NIK-> IKK-> NF-kappaB sig-

- nal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun* **69**(4):2270-6.
- Wood, W. (1991) "Matrix effects" in immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **205**:105-12.
- Xu, Y., X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. Manley, L. Tong (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**(6808):111-5.
- Yang, R., M. Mark, A. Gurney, P. Godowski (1999) Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**(2):639-43.
- Yokoo, T., M. Kitamura (1996) Dual regulation of IL-1 beta-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in mesangial cells by NF-kappa B and AP-1. *Am J Physiol* **270**(1 Pt 2):F123-30.
- Zheng, L., L. Zhang, H. Lin, M. McIntosh, A. Malacrida (2005) Toll-like receptors in invertebrate innate immunity. *Invertebrate Survival J* **2**:105-113.