



Toll Benzeri Reseptörler

Toll-Like Receptors

Aycan Kundakcı, Arash Pirat

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZET

Toll benzeri reseptörler (toll-like receptors, TLR) doğal immün sistemin patojenler ile ilk karşılaşma aşamasında kilit rol oynayan protein yapılarıdır. Bu reseptörler sayesinde doğal immün sistem patojenlerin yapısını tanıyarak ve inflammatuar yanıtı başlatır. Bu reseptörler aynı zamanda doğal immün sistem ile edinilmiş immün sistem arasında da köprü görevi görürler. TLR'lerden özellikle TLR2 ve TLR4'ün sepsis patogeneğinde önemli görev üstlendikleri bilinmektedir. Bu reseptörlerin hücre içi inflammatuar sinyal yollarını harekete geçirme mekanizmaları ile ilgili bilgiler arttıkça bu yolların modülasyonu önemli bir tedavi hedefi haline gelmiştir. Son yıllarda TLR'lerin enfeksiyöz olaylar dışında yoğun bakım hastalarını sıklıkla ilgilendiren iskemi reperfüzyon hasarı ve travma gibi enfeksiyöz olmayan olaylarda da önemli görev oynadıkları gösterilmiştir. TLR2 ve TLR4'ün ısı şok proteinleri ve serbest oksijen radikalleri tarafından da aktive olabildikleri ve bu aktivasyon mekanizmasının enfeksiyöz mekanizmalardan farklı olduğu da ortaya konmuştur. Bu derlemede TLR'lerin enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan aktivasyonları ve hücre içi yollarını ilgilendiren bazı özel durumlarda bu reseptörlerin üstlendikleri rol ve olası gelecek tedavi yaklaşımlarına değinilecektir. (Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi 2012; 10: 63-73)

Anahtar Kelimeler: Toll benzeri reseptörler

SUMMARY

Toll-like receptors (TLR) are a class of proteins that play a key role during the first step of interaction between the pathogens and innate immune system. TLRs help innate immune system to recognize microbial ligands and initiate inflammatory response. Toll-like receptors are also an important link between innate and adaptive immunity through their presence in dendritic cells. The central role of TLR2 and TLR4 in the pathogenesis of sepsis has been clearly demonstrated. As our insight into the mechanisms that induce TLR-associated intracellular pathways increases, the modulation of these pathways turns to be an interesting therapeutic target in septic patients. Recently there has been increasing evidence that TLRs play an important role in commonly encountered non-infectious problems in critically patients such as ischemia reperfusion injury and trauma. It has also been demonstrated that comparing with microbial ligands, heat shock proteins and reactive oxygen species may also activate TLR2 and TLR4 through a different mechanism. In this review, the infectious and non-infectious activation mechanisms of TLRs, their intracellular pathways, and the potential therapeutic approaches that use TLRs or their pathways will be discussed. (Journal of the Turkish Society Intensive Care 2012; 10: 63-73)

Key Words: Toll-like receptors

Giriş

İmmün sistem, doğal ve edinilmiş olmak üzere iki ana bölümde incelenir. Evrim sırasında gelişen ve tüm hayvan ve bitki sınıflarında var olan doğal immünite patojenlerin tanınması için toll benzeri reseptörler (toll like receptors, TLR) ailesini kullanır. Toll genleri, protein yapısında olan TLR'leri kodlar. Toll geni ilk defa 1985'te Nobel ödüllü Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından bir meyve sineği olan *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmıştır. İlk olarak toll geninin bu sineklerin dorsal-ventral akslarının embriyogenezinde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur. Takip eden yıllarda bu genin memelilerde de var olduğu ve hem memeliler hem omurgasızlarda doğal immünite için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Bu gen ve reseptör ailesinin adı 1985'te bu geni ilk bulan ekipten olan Nüsslein-Volhard'ın meyve sineği larvasının dorsal vücut bölümüne göre az gelişmiş olan ventral bölgesini fark ettiğinde hayretini dile getirmek için söylediği "Das ist ja toll" cümlesinden gelmektedir. Almanca'da toll "inanılmaz" veya "harika" demektir.

TLR'ler doğal immünitenin parçaları olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleridir. Bu reseptörler ligandların tanınmasından sorumlu ekstraselüler bölüm, transmembran heliks bölümü ve sinyal yollarının başlangıcı olan intraselüler toll-like/interlökin-1 reseptör (TIR) bölümü olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır. İnsanlarda TLR ilk Nomura ve arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmıştır. Ancak o zaman meyve sineğindeki toll'ün immün sistemdeki rolü bilinmediğinden bu reseptörün memelilerin gelişiminde rol oynadığı düşünülmüştür (1,2). TLR'ün insanlarda edinilmiş immün sistemi de harekete geçirebileceği 1997'de Janeway ve Medzhitov tarafından gösterilmiştir (3). TLR4'ün lipopolisakkaritleri algılayan bir reseptör olarak işlev gördüğünü gösteren Dr. Beutler ve Dr. Hoffmann 2011'de bu keşifleri ile Nobel ödülüne layık görülmüşler. Günümüzde insanlarda 12 adet fonksiyonel TLR ve bu reseptörler için birçok ligand tanımlanmıştır. TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 çoğunlukla hücre yüzeyinde lokalize olup patojenlere spesifik molekülleri tanırlar. TLR 3, 7, 8 ve 9 ise intraselüler organellerin içinde lokalize olurlar. TLR ilişkili sinyal yollarının uyarılması sonucunda interlökin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile birlikte edinilmiş immün sistemin aktive olmasında rol oynayan "eş zamanlı uyarı (costimulatory) moleküllerinin" ekspresyonu da gerçekleşmiş olur. Böylece hem doğal hem de edinilmiş başışıklık sistemleri aktive edilmiş olur.

TLR'ler immün savunma sisteminin ilk basamağında rol oynarlar. Patojenlerde konakta bulunmayan ve "patojen ilişkili moleküler kalıplar" (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) olarak adlandırılan bileşenler bulunmaktadır (4). Enfeksiyon sırasında makrofajlar PAMPs'ı TLR'ler aracılığı

ile tanırlar. TLR sinyal mekanizması ile proinflamatuvar sitokin ve nitrik oksit gibi antimikrobiyal küçük moleküllerin üretimi indüklenir ve makrofaj aktivasyonu ortaya çıkar. Böylece enfeksiyonun erken aşamasında makrofajlar mikroorganizmaların eliminasyonu için aktive olurlar. Ancak doğal immün sistem aktivasyonunun patojenlerin yok edilmesinde sınırlı rolü vardır. Edinilmiş immün sistem aktivasyonu ile daha efektif bir konak yanıtı oluşur. TLR'lerin uyarılması sonucunda, perifer dokular ile lenfoid dokular arasındaki iletişimi sağlayan dendritik hücre aktivasyonu başlar ve bu olayların sonucunda edinilmiş immün sistemin en önemli bileşeni olan T-hücre aktivasyonu gerçekleşir (5-10).

Başlangıçta, TLR'lerin bakteriyel ligandlar ile olan etkileşimleri ve enfeksiyon ve sepsisin hücresel aktivasyondaki rolleri tanımlanmıştır. Ancak son çalışmalarda, TLR ailesinden TLR2 ve TLR4'ün PAMPs dışında belli endojen molekülleri de ligand olarak tanıyabildikleri gösterilmiştir. Bu ligandlar arasında "tehlike ilişkili moleküler kalıplar" (danger associated molecular patterns, DAMP) ve inflame dokudaki diğer moleküller de yer almaktadır. Örneğin farelerde ısı şok proteini 60 (Hsp60) ile TLR4 üzerinden inflamasyonun tetiklendiği gösterilmiştir (11). TLR'ler için tanımlanan PAMPs ve PAMPs-olmayan ligandlar sadece TLR aktivasyonu ve konak savunma yanıtı için değil, çeşitli inflamatuvar süreçlerin oluşmasında da önemli rol oynarlar. Son hayvan çalışmalarında, kanama ve iskemi/reperfüzyon hasarı gibi bakteriyel olmayan olaylarda da TLR2 ve TLR4 aktivasyonunun, önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Tablo 1).

1998'de TLR4-mutant farelerde lipopolisakkarite (LPS) karşı yanıtların yetersiz olduğu genetik analizlerle gösterilmiştir (12,13). *Leptospira* ve *Porfiromonas*'a ait LPS'in TLR2 yoluyla inflamatuvar yanıtı neden olurken, gram negatif bakterilerin LPS'inin genel olarak TLR4 yoluyla inflamatuvar yanıtı başlattığı kabul edilmektedir (14,15). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan (PGN), LPS ile oluşan immün yanıtı benzer reaksiyonlar ortaya çıkarır. TLR2-mutant farelerde, PGN'a karşı yanıt oluşturmak için TLR2'nin gerekli olduğu gösterilmiştir (16). TLR2 aynı zamanda *Mycoplasma*, *Mycobacteria* ve *Neisseria*'lar gibi diğer mikroorganizmalara ait ligandlar yoluyla da aktive olabilmektedir (17,18). TLR2'nin bu kadar çok çeşitli PAMP'ı tanıyabilmesinin sebebi, diğer TLR'ler ile oluşturabildiği heterodimerlerdir (TLR1/TLR2, TLR2/TLR6 gibi).

Yoğun bakımda sepsis başta olmak üzere birçok olayda TLR'lerin öneminin anlaşılması ile bu reseptörler hem ilgi gören bir araştırma konusu hem de önemli bir tedavi hedefi haline gelmiştir. Bir anti-TLR4 olan eritoran ile sepsisli hastalarda gerçekleştirilen çok merkezli ACCESS çalışması bu saptamanın en önemli kanıtlarındandır (www.clinicaltrials.gov, NCT00334828). Bu derlemede TLR'ler ile ilgili temel bilgilere yer verilerek bu konuya ilgi duyanlar için bir başlangıç kaynağı oluşturulması amaçlandı.

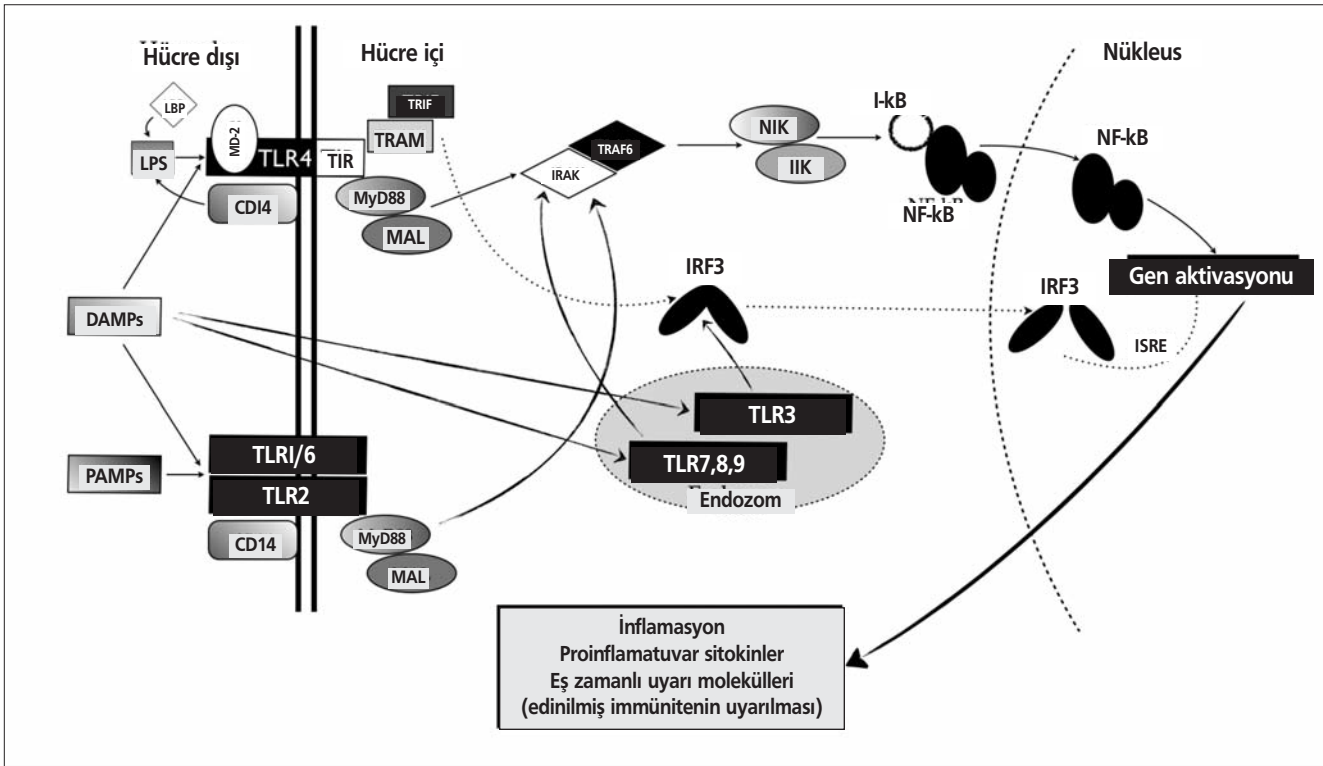
TLR4 ve Lipopolisakaritler (Şekil 1)

LPS'ler, gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan PAMPs'dır. LPS'lerin 3 parçası vardır: Lipid A, oligosakkarit çekirdek ve distal polisakkarit (O antijeni) (19). Hücre yüzeyine gömülü olan Lipid A parçası, tek başına doğal immün sistemi aktive etmede yeterlidir. Lipid A, IL-12 ve nitrik oksit gibi moleküllerin üretimini indükler. Yeterli miktardaki LPS, klinik olarak hayatı tehdit eden endotoksemiye sebep olabilir. CD14 adı verilen, LPS'i hücre yüzeyinde tutan bir glikozilfosfatidilinositol (GPI) protein tanımlanmıştır. Lipid A'nın CD14'e bağlanması ile in vivo olarak septik şok sendromunun ortaya çıktığı gösterilmiştir (20,21).

TLR'ler, kendi ligandları ile etkileşerek sinyal transdüksiyon kaskadını aktive eder ve sonuçta immün yanıtın sorumlu genlerin ekspresyonunu sağlarlar. TLR'lerin ligandlarını

tanıması her zaman onlara doğrudan bağlanmak şeklinde olmamaktadır. TLR4 diğer TLR'lerden farklı olarak ligandlarına doğrudan bağlanmaz. TLR4 ile ekspresyonu gerçekleşen MD2 adı verilen molekül, TLR4'ün ekstraselüler kısmı ile bağlanarak, TLR4'ün ligandları ile etkileşime girmesini kolaylaştırır (22,23). TLR2 ve TLR4'ün kendi ligandları ile etkileşimi hücresel aktivasyona neden olur. Bu aktivasyon "myeloid differentiation primary response gene" (MyD88) ve MyD88 adapter-like (Mal) moleküllerini içeren ortak bir yolak ile ortaya çıkar.

Aksesuar moleküller olan lipid bağlayıcı protein (LBP) ve CD14, LPS'leri bakteri membranından ayırarak, ligandın MD2'ye transferini sağlarlar. TLR'lerin intraselüler kısmı IL-1 resptörünün (IL-1R) intraselüler kısmına benzerlik göstermektedir. Bu sebeple Toll-like/interlökin 1 reseptör (TIR) olarak isimlendirilmiştir (24). TLR'ün ekstraselüler



Şekil 1. Toll-benzeri reseptörler ve yolları. TLR'lerden TLR1, 2, 4, 5, 6 ve 10'un transmembran yerleşim gösteren ekstra-ve intraselüler bölümleri bulunurken TLR3, 7, 8 ve 9 hücre içinde endozoma yerleşiktirler. Dolaşımda bulunan LBP ile hücre yüzeyinde bulunan CD14 ve MD2 yardımcı proteinlerdir ve TLR4'ün LPS'e bağlanmasını sağlarlar. LPS veya DAMPs ile TLR4'in etkileşimi sonucunda intraselüler yollar aktive olur. Bu aşamadan sonra hücresel aktivasyon iki farklı yol ile gerçekleşebilir. TIR, MyD88 ve MAL üzerinden gerçekleşen yolda IRAK ve TRAF6 aktivasyonu ile NIK ve IKK fosforilasyonu ortaya çıkar. Bu şekilde NF-kB sitoplazmada bağlı bulunduğu inhibitör proteinden (I-kB) kurtularak nükleusa geçer ve orada kB bağımlı genleri aktive ederek inflamasyon, proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesi ve edinilmiş immün sistemin uyarılmasına neden olur. Alternatif bir yol olarak, TLR4 ve LPS etkileşimi sonrası TIR, TRAM ve TRIF aktivasyonu ile IRF3 dimerizasyonu gerçekleşir. Dimerize olan IRF3 sitoplazmadan nükleusa geçerek ISRE ile bağlanır ve yine benzer etkileri olan genlerin transkripsiyonunu başlatır. TLR2'nin TLR1 veya TLR6 ile oluşturduğu heterodimer ise PAMPs ile etkileşime girdikten sonra TLR4'ün kullandığı ilk yol üzerinden NF-kB aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. DAMPs hücre içinde endozomda bulunan TLR3, 7, 8 ve 9 ile etkileşime girebilir. Bu etkileşim sırasında TLR3 gen aktivasyonunu IRF3 yolağı üzerinden gerçekleştirirken TLR7, 8 ve 9 IRAK ve TRAF6 üzerinden ilerleyen yolağı harekete geçirirler. TLR, toll-like receptor; LBP, lipoprotein binding protein; LPS, lipopolisakarit; DAMP, danger-associated molecular patterns; TIR, toll-like/interleukin-1 receptor; MyD88, myeloid differentiation primary response gene 88; MAL, MyD88 adapter-like; IRAK, interleukin-1 receptor associated kinase; TRAF6, TNF receptor associated factor 6; NIK, nuclear factor-kB inducing kinase; IKK, I-kB kinase; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; TRAM, TRIF-related adapter molecule; IRF3, interferon regulatory factor 3; ISRE, interferon sensitive response element; PAMP, pathogen-associated molecular pattern.

kısının aktivasyonu, TIR dimerizasyonuna neden olur ve MyD88, Mal, TIR ilişkili yapı iskeleti proteinlerinden olan IFN- β (TRIF) ve TRIF ilişkili adaptör molekülün (TRAM) bağlanması için konformasyonel değişiklikler olur. Bu komplekslerin bir araya gelmesi ile sinyal yolları aktive olur ve IL-1R-ilişkili kinaz (IRAK) fosforilasyonu ve TNF-reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) aktivasyonu gerçekleşir. TRAF6 aktivasyonu, NF- κ B ilişkili kinazın (NIK) ve I- κ B kinaz (IKK) aktivasyonuna neden olur. Bu olayların sonucunda NF- κ B'nin nükleusa translokasyonu gerçekleşir ve κ B bağımlı genler aktive olur. Bu genler arasında proinflamatuvar sitokinler ile inflamatuvar ve immün yanıtın diğer mediatörleri ile beraber edinilmiş immün sistemin aktivasyonunu sağlayan "eş zamanlı uyarı (costimulatory) moleküllerinin" gen ekspresyonu da yer almaktadır (1-4). Böylece edinilmiş bağışıklığın aktivasyonu sağlanmış olur. TLR4'ün aşırı ekspresyonu sonucu NF- κ B aktivasyonu ve sitokin üretimi artar.

TLR2 ve TLR4 tarafından aktive edilen sinyal yolları ile ilgili son çalışmalara ek olarak, TLR2 ve TLR4 ile aksesuar moleküllerin ve bunların ligandları ve antagonistleri arasındaki moleküler etkileşimleri de anlaşılmasına çalışılmaktadır.

Bir sitoplazmik protein olan MyD88, tüm IL-1R ve TLR ailesi ile etkileşime geçebilir ve TLR ailesinin sinyal mekanizması için MyD88'in gerekli olduğu gösterilmiştir (25-28). MyD88, IL-1R-ilişkili kinaz (IRAK) ve TNF-reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) arasında oluşan kompleks sonucu NF- κ B ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskadı aktive olur (26,29). Ancak MyD88 olmayan farelerde, LPS ile ortaya çıkan NF- κ B ve MAPK kaskadı aktivasyonunun geç başlaması, TLR4'ün bu kaskadları aktive etmede MyD88'den bağımsız bir şekilde de hareket edebildiğini göstermektedir (30). MyD88 eksik olan makrofajlarda, LPS'e karşı oluşan sitokin yanıtının bozulmasına rağmen, NF- κ B aktivasyonu korunmaktadır. Bunun yanında MyD88 eksik olan farelerde nitrik oksit üretimi, B hücre formasyonu ve endotoksemik şok yanıtı da bozulmuş olur (30). TLR4 ve MyD88 eksik olan dendritik hücrelerde de sitokin üretimi bozulmuş olur. Ancak kostimülatör moleküllerin ekspresyonu MyD88 eksik olan farelerde korunmuştur. Tüm bu veriler TLR4'ün hem MyD88 bağımlı hem de MyD88 bağımsız yollarda önemli rol oynadığını göstermektedir. IRAK aktivasyonu MyD88 bağımsız yolda bozulmuştur. IRAK aktivasyonu olmayan durumlarda da NF- κ B ve MAPK kaskadlarında gecikmiş aktivasyon söz konusudur (31). TRAF6 eksik olan embriyonik fibroblastlarda da bozulmuş ancak saptanabilir miktarlarda NF- κ B aktivasyonu gecikmiş olarak ortaya çıkabilmektedir.

LPS sinyal transdüksiyon kaskadında yer alan moleküller, sepsisin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel hedef moleküllerdir. TLR antagonistleri ile zararlı proinflamatuvar sitokinlerin etkileri azaltılabilir. TLR2 ve TLR4 inhibisyonu, kritik hastalıkta klinikte kullanılmak üzere olası terapötik yaklaşımlar sağlamıştır. Sepsis ve septik şok tedavisi için, Lipid A'nın bir çok sentetik türevi üretilmiştir. Eritoran (E5564),

Rhodobacter sphaeroides'in patojen olmayan LPS'sinin bir bileşeni olan Lipid A'nın sentetik bir türevidir. Bu bileşik, TLR4-MD2 kompleksinin antagonisti olarak rol oynamaktadır ve faz 3 klinik çalışması devam etmektedir (32,33). TLR2 ve TLR4'ün non-septik akut organ hasarındaki potansiyel rolleri ve non-bakteriyel koşullarda, TLR2 ve TLR4 ilişkili hücrel aktivasyonun inhibisyonunun kritik hastalıkta sonuçları iyileştirmesinin potansiyel yeri de son çalışmalarda incelenmeye başlanmıştır.

TLR2 ve TLR4'ün sinyal yolları (Şekil 1)

TLR2/TLR1 veya TLR2/TLR6 heterodimerinin veya TLR4 homodimerinin ligandları ile etkileşimi intraselüler sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur. Burada toll benzeri/interlökin 1 reseptör (TIR), MyD88 ve "MyD88 adapter like" (Mal) moleküllerinin etkileşimi ve I κ B α kinaz (IKK) kompleksinin aktivasyonu sonucunda 26S proteozomda bulunan NF- κ B inhibitörü I κ B α parçalanır (34-36). I κ B α sitoplazmik konsantrasyonlarının azalması ile NF- κ B sitoplazmadan nükleusa girerek, κ B bağımlı genleri aktive eder. Bu genler arasında proinflamatuvar sitokinler ve inflamatuvar ve immün yanıtın diğer mediatörleri yer almaktadır (34-37).

TLR2 ve TLR4'ün kendi ligandları ile etkileşimi hücrel aktivasyona neden olur. Bu aktivasyon myeloid differentiation primary response gene-88 (MyD88) ve MyD88 adapter-like (Mal) moleküllerini içeren ortak bir yolak ile ortaya çıkar (34). TLR4 ilişkili mekanizma, alternatif bir yol ile de oluşabilir. Bu yolda Toll/IL-1 reseptör (TIR) birimi, diğer TIR ilişkili yapı iskelesi proteinlerinden olan IFN- β (TRIF) ve TRIF ilişkili adaptör molekül (TRAM) indüksiyonu yapar ve bu da interferon düzenleyici faktör 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) dimerizasyonu ve aktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak interferon- γ gibi IRF-3 bağımlı genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (34,38) (Şekil 1).

CD14, TLR spesifik ligandlardan olan peptidoglikan veya lipoteikoik asitlerin TLR2'ye ve LPS'lerin TLR4'e bağlanmasını sağlayarak TLR2 ve TLR4 aktivasyonunu kolaylaştırır (Şekil 1). TLR4 tek başına hücrelerin LPS'e olan yanıtından sorumlu değildir. Bunun için MD2 adında TLR4 ile kompleks oluşturan ek bir proteine ihtiyaç vardır (23). Hayvan çalışmalarında MD2 mutant farelerde LPS'e yanıt oluşmadığı ve endotoksemi ilişkili mortaliteden korundukları gösterilmiştir (39).

İskemi-Reperfüzyon Hasarında TLR2 ve TLR4

İnme, miyokard enfarktüsü ve solid organ transplantasyonunda ortaya çıkan iskemi reperfüzyon hasarının TLR2 ve TLR4 üzerinden artabileceği ile ilgili kanıtlar giderek artmaktadır. TLR4 veya TLR4 ilişkili yapısal iskelet proteini MyD88 eksikliği olan transgenik farelerde, hemoraji, miyokard enfarktüsü veya böbrek iskemi reperfüzyon hasarını takiben gelişen organ disfonksiyonlarının azaldığı in vivo olarak gösterilmiştir (Tablo 1) (40-42). Bu inflamasyon modellerinde,

Tablo 1. TLR2 ve TLR4'ün enfeksiyöz olmayan ligandlar ile aktivasyonu

Patoloji	Uyaran/ligand	TLR	Kofaktörler	Sinyal mekanizması ve gen aktivasyonu
İskemi reperfüzyon	Ksantin oksidaz veya NADPH oksidaz bağımlı süperoksit	TLR2 TLR4	MyD88 bağımlı	TNF- α , MIP2, IL6, IL1 β , MCP1, IL12, KC
Hemoliz, travma, hematoma, rabdomiyoliz, hemoraji	Hem	TLR4	MD2 bağımsız	TNF- α , KC
Travma	Hiyalüronik asit fragmanları	TLR2 TLR4	MD2, MyD88 ve CD44 bağımlı CD14 bağımsız	TNF- α , MIP2, IL6, CXCL-2, MMP13, TGF β
Travma	HMGB1	TLR2 TLR4	IL-1 β , DNA, LPS, IL-1R, TLR9, TLR4 MyD88, TIRAP, IRAK1, IRAK2, IRAK4	TNF- α , IL1 α , IL1 β , IL1Ra, IL6, IL8, MIP1 β , MIP2
İskemi reperfüzyon, travma, egzersiz, stres	Isı şok proteinleri	TLR2 TLR4	MD2, MyD88 ve TRAF6 (Hsp60)	gen aktivasyon paterni her HSP için farklıdır

TLR, toll-like receptor; LPS, lipopolisakarit; TIR, toll-like/interleukin-1 receptor; MyD88, myeloid differentiation primary response gene 88; MAL, MyD88 adapter-like; IRAK, interleukin-1 receptor associated kinase; TRAF6, TNF receptor associated factor 6; HSP, heat shock protein; MIP, macrophage inhibitory protein;

dolaşımda LPS yer almamakta ve LPS'in TLR4 aktivasyonuna neden olduğuna dair kanıt da bulunmamaktadır. Örneğin, TLR4'ün nötrofil aktivasyonu, akciğerde artmış TNF- α konsantrasyonları ve dolaşımda ksantin oksidaz seviyelerinin artması ve reaktif oksijen radikallerinin artmış üretimi ile ilişkili olarak ortaya çıkan kanamaya sekonder akut akciğer hasarı gelişiminde anahtar reseptör olduğu gösterilmiştir (40). Buna benzer olarak, kanama ve resüsitasyonu takiben ortaya çıkan mezenterik endotelial disfonksiyonda da TLR4'ün yeri olduğu gösterilmiştir (43). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, nonfonksiyonel TLR4'ü olan C3H/HeJ farelerde koroner ligasyon sonrası enfarkt alanı daha küçük bulunmuştur. Bu bulguya dayanarak TLR4'ün miyokard iskemisi ile ortaya çıkan hücrel sinyallerin aktivasyonunun transdüksiyonu için gerekli olduğu ortaya konmuştur (41).

Benzer şekilde, TLR2 yokluğunda, sol ön inen koroner arterin bağlandığı kardiyak iskemi reperfüzyon modelinde, daha küçük enfarkt alanı ve azalmış endotel disfonksiyonu ile lökosit infiltrasyonu olduğu gösterilmiştir (44). TLR2, TLR4 ve MyD88 renal iskemi reperfüzyona bağlı renal disfonksiyona da katkıda bulunurlar (42,45-47).

Süperoksit gibi oksijen radikalleri, akut inflamatuvar yanıtların başlatılması ve artmasında rol oynarlar (48-50). In vivo çalışmalarda, süperoksit üretiminin proinflamatuvar olduğu gösterilmiştir. Örneğin, süperoksit dismutaz inhibisyonu veya ksantin oksidaz ile süperoksitin aşırı üretimi sonucu çok daha ciddi kanama ilişkili organ disfonksiyonları gösterilmiştir (51,52). Bunun tersine, süperoksit dismutazın aşırı üretimi nedeniyle, süperoksitin ortamda bulunmaması farelerde, kanama veya diğer iskemik olaylarla ilişkili organ disfonksiyonlarında daha iyi sonuçlar doğurmuştur (53,54).

İskemi reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz ekstraselüler süperoksitin önemli kaynaklarıdır. Ksantin oksidaz ile ortaya çıkan ekstraselüler süperoksitin nötrofilleri aktive ettiği ve indüklenen nötrofil ilişkili proinflamatuvar yanıtın TLR4 bağımlı mekanizmalarla ortaya çıktığı gösterilmiştir (55). Ksantin oksidazın süperoksit oluşumundaki katalitik aktivitesi, TLR4 ilişkili sinyal yollarının ve proinflamatuvar yanıtların aktive olması için gereklidir (55). Buna göre ksantin oksidaz ve NADPH oksidaza göre süperoksitin proinflamatuvar yanıtlar için majör bir mediatör olduğu söylenebilir. Ksantin oksidazın TLR4'e bağlanabildiği ve süperoksitin nötrofilleri aktive etmesi için ksantin oksidaz tarafından hemen TLR4 komşuluğunda oluşması gerektiği gösterilmiştir (55). Benzer olarak, NADPH alt grubu olan NOX4 (gp 47phox) TLR4'e bağlanabilir ve NOX2 (gp91phox) ise TLR2 ile ilişkilidir (56,57).

Ekstraselüler süperoksitin TLR4 üzerinden indüklediği hücrel aktivasyonun kesin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. İntraselüler sinyal yollarının başlaması için gerekli olan TLR4 dimerizasyonunu direkt olarak sağlayabilmek ile beraber, süperoksit TLR4 ilişkili sinyal yollarını indirekt olarak da etkileyebilir. Örneğin, indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) artmış aktivasyonu ve bunun sonucunda açığa çıkan nitrik oksit, septik şok ve diğer kritik hastalık süreçlerinde söz konusudur (58). Çünkü süperoksit NO ile etkileşime girerek, peroksinitrit oluşturur. TLR4 ve peroksinitrit arasındaki etkileşimler ile de süperoksitin TLR4 ile direkt ilişkisi söz konusu olmadan da hücrel aktivasyon indüklenmiş olur.

Süperoksit dışındaki diğer reaktif oksijen radikalleri de TLR4 bağımlı mekanizmalar ile inflamatuvar süreçleri düzenler.

Örneğin süperoksitin dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksitin hemorajik şokta, TLR4'ün membran lipidlerindeki lokalizasyonunu artırdığı gösterilmiştir (59). Son çalışmalarda, hiperoksi veya intestinal iskemi reperfüzyon ile ortaya çıkan akut akciğer hasarında, inflamasyonun TLR3 bağımlı olduğunun gösterilmesi ile beraber, diğer TLR'lerin de ROS ilişkili inflamasyonda önemli olabileceği düşünülmektedir (60,61).

Travmada TLR2 ve TLR4

Travma sonrası kanama ilişkili sistemik veya bölgesel hipoperfüzyona bağlı doku hasarı, nekrotik hücrelerden endojen TLR4 ligandlarının (DAMPs) salıverilmesini indükler. Bu endojen nonbakteriyel mediatörler ile etkileşim sonucu TLR4'ün aktivasyonu inflamasyona ve akut akciğer hasarı ve diğer organ hasarlarının gelişimine katkıda bulunur.

Hemoglobinin yapısında bulunan hem, TLR4'ü LPS'in kullandığından farklı bir mekanizma ile aktive edebilir. Hemoliz veya yaygın doku hasarı ile ilişkili olan patofizyolojik durumlarda dolaşımda yüksek miktarda serbest hem ortaya çıkar. Örneğin travma, iskemi reperfüzyon hasarı, hemoglobinopatiler, hematomlar, kanama veya kas hasarı sonucu oluşan rabdomiyoliz ile dolaşımda artmış miktarda serbest hem ve hem ilişkili moleküller bulunur (62,63). Artmış hem, ROS'un artmış üretimi ile ilişkilidir (64). Makrofajların hem ile karşılaşması sonucu, MyD88, CD14 ve TLR4 aracılı mekanizmalar ile proinflamatuvar sitokinler ve tümör nekroz faktör- α 'nın (TNF- α) artmış üretimi söz konusu olur (65). TLR4'ün hem ile aktive olabilmesi için demir ve porfirin halkasının vinil gruplarına ihtiyaç vardır (65).

Hem ile ortaya çıkan TLR4 ilişkili sinyal yollarının aktivasyonu, TLR4/MD2 ve LPS arasındaki etkileşim mekanizmalarından farklı bir mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Çünkü antiTLR4/MD2 antikorları LPS ilişkili TNF- α sekresyonunu inhibe eder ama makrofaj-hem etkileşimi ile ortaya çıkan TNF- α sekresyonunu etkilemez (Tablo 1) (65).

Ekstraselüler matriksin majör glikozaminoglikanlarından olan hiyalüronik asitin (HA), inflamasyon ve doku hasarında küçük parçalar halinde ortamda bulunduğu gösterilmiştir (66,67). Yüksek molekül ağırlıklı HA (2-6x10⁶ Da) in vivo hiyaluronidaz β -glukuronidaz ve heksozaminidaz ile polimerize olduğunda küçük molekül ağırlıklı (0.2x10⁶ Da) parçalara dönüşebilir. Travma sonrası ekstraselüler matriksten bu küçük molekül ağırlıklı HA parçalarının salıverildiği gösterilmiştir (68). In vivo olarak küçük molekül ağırlıklı HA'nın aktif inflamatuvar olaylarla ilişkisinin gösterilmesinin yanında, aynı zamanda HA klirensinin CD44 bağımlı olarak azalması da akciğerde inflamasyon ve hasara katkıda bulunur (Tablo 1) (69-71). Düşük molekül ağırlıklı HA fragmanlarının, makrofajlardan inflamatuvar sitokinlerin üretimi için MD2, MyD88, TLR2 ve TLR4'e ihtiyaç duydukları fare çalışmalarında gösterilmiştir (66,72).

Düşük molekül ağırlıklı HA fragmanları TLR4 ilişkili sinyal yolları aktivasyonunu LPS ilişkili mekanizmalardan farklı olarak gerçekleştirir. TLR4 ilişkili sinyal yolları aktivasyonu için, düşük molekül ağırlıklı HA fragmanları MD2'ye ihtiyaç duyarken CD14'e ihtiyaç duymazlar (Tablo1). Düşük molekül ağırlıklı HA fragmanları hücre membranında, TLR4 ve CD44 arasında etkileşime neden olarak sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur (68). Ayrıca HA fragmanları ile gerçekleşen monositlerdeki gen aktivasyonunun da LPS etkileşimi sonrası ortaya çıkandan farklı olduğu gösterilmiştir (Tablo 1) (68). NF- κ B bağımlı moleküllerden TNF- α , MIP-2 ve monocyte chemottractant protein 1 (MCP-1) gibi bazı moleküller HA ve LPS tarafından benzer şekilde eksprese olurken granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ve IL-1 α gibi diğer moleküller ise LPS'e göre HA ile farklı şekilde eksprese olurlar (68). Bu bulgular, steril TLR4 aktivasyonundaki gen ekspresyonunun sepsisteki TLR aktivasyonununkinden farklı olduğunu göstermektedir.

Geç İnflamasyonda TLR4

TLR4, high mobility group box-1 protein'in (HMGB1) katkıda bulunduğu geç inflamatuvar yanıtta da katkıda bulunur. Nükleer nonhiston DNA bağlayıcı protein olarak tanımlanan HMGB1, özellikle IL-1 β , LPS veya DNA gibi proinflamatuvar mediatörlere bağlandığında ekstraselüler inflamasyonda rol oynar (73-76). Farelerde endotoksinle karşılaşmadan sonra, geç dönemde serumda HMGB1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (73,77). İnsanlarda travmadan 6 saat sonra HMGB1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (78). HMGB1'in proinflamatuvar etkileri farelerde intratrakeal enjeksiyonu sonrası akut akciğer hasarı geliştirmesi ile gösterilmiştir (79). Tedavide gecikme olmasına rağmen ve erken proinflamatuvar yanıtların ortaya çıkmasından sonra verildiğinde antiHMGB1 antikorlarının farelerde LPS ile indüklenmiş mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (73). LPS'in indüklediği akut akciğer hasarı modelinde anti-HMGB1 verilmesi ile IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin akciğer konsantrasyonları değişmezken akciğer hasarının ciddiyeti azalmıştır (79). Benzer olarak, peritoniti olan septik farelerde, çekal ligasyon perforasyonuna bağlı enfeksiyonun başlangıcından sonraki 24 saat içinde anti-HMGB1 antikorları verildiğinde mortalitenin azaltılabildiği gösterilmiştir (80).

Geçici transfeksiyon yapılan immortalize insan embriyonik böbrek 293 hücrelerinde HMGB1'in TLR2 ve TLR4 üzerinden hücresel aktivasyon ve NF- κ B bağımlı transkripsiyonu indüklediği gösterilmiştir (81). Çalışmalarda HMGB1'in TLR4'ten başka TLR2 ile olan etkileşimleri de gösterilmiştir. HMGB1'in TLR2 ve TLR4 ile olan etkileşimleri, HMGB1'in LPS ile ortaya çıkan hücresel aktivasyona ve inflamatuvar yanıtlarına benzer etkilerini açıklayabilmektedir (81). Buna rağmen, HMGB1'in kendisinin proinflamatuvar etkisi yoktur. Sitokin üretimini makrofajlar ve diğer hücrelerde DNA'ya bağlandıktan

sonra ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinler yoluyla gerçekleştirir (Tablo 1) (75). Bu bulgular HMGB1 ile TLR2 ve TLR4 arasındaki etkileşimlerin doğrudan değil, HMGB1'e bağlı kofaktörler aracılığı ile sağlandığını düşündürmektedir. Bu konuda yeni çalışmalara gereksinim vardır.

TLR2, TLR4 ve Heat Shock Proteinleri

Hsp60, Hsp70, Hsp72, Hsp90 ve gp96 gibi ısı şok protein (HSP) ailesinin üyeleri, CD14/TLR2 ve CD14/TLR4 reseptör kompleksleri aracılığı ile proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyebilmektedirler (82). Hsp60, TLR2 üzerinden TNF- α ekspresyonunu indükler ve TNF- α ekspresyonunu TLR4 ve MD2 ile MyD88 ve TNF reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) ile etkileşime girerek artırır (Tablo 1) (83). HSP'ler primer olarak olgunlaşmamış polipeptid zincirlerini ve kısmen katlanmış protein ara ürünlerini tanıyıp onlara bağlanırlar ve böylece bu tip proteinlerin agregasyonunu önleyen moleküler şaperonlar gibi rol oynarlar (84-86).

HSP'ler esas olarak patofizyolojik durumlarda artmış seviyelerde eksprese edilirler. Örneğin nekrotik hücre ölümü sonucu, HSP'ler ekstraselüler kompartımana sızarlar (87). Buna ek olarak, HSP'ler nekrotik hücre ölümünden bağımsız olarak iskemi reperfüzyon hasarı (82-88), travma (89) ve ağır egzersiz (90) gibi durumlarda ekstraselüler olarak da salıverilebilmektedirler. Buna rağmen, HSP'lerin TLR aracılı mekanizmalar ile hücre aktivasyonunu nasıl sağladığı tam olarak anlaşılamamıştır. HSP'ler ve TLR'ler arasındaki etkileşimlerin önemi tartışmalı bir konudur (91,92).

Son çalışmalarda HSP'lerin hücre aktivasyon mekanizmasının incelenmesi için LPS içermeyen rekombinan HSP'ler kullanılmıştır. Hücrelerin HSP'lere maruz kalması sonucu LPS ile gerçekleşen proinflamatuvar sitokin ekspresyonundan farklı ve TLR4-bağımlı olan spesifik bir düzen olduğu gösterilmiştir. Örneğin, hepatik iskemi reperfüzyonda hücreler tarafından Hsp72 salıverildiği gösterilmiştir (93). Bu hepatositlerin saflaştırılmış insan rekombinan Hsp72 ile uyarılması ile TNF- α veya IL-6 üretimi olmazken, MIP-2 üretiminde doz bağımlı artış gösterilmiştir. TLR-4 eksik olan farelerde, hepatositlerin MIP-2 üretimi belirgin olarak azalmıştır (93). Bir diğer çalışma ise, Hsp72'nin iskemi reperfüzyon hasarında TLR4 bağımlı bir mekanizma ile rol oynadığını ve rekombinan Hsp72 ile NF- κ B aktivasyonunun gerçekleştiğini ve yine TLR4 bağımlı mekanizma ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 ekspresyonlarının arttığını ve miyokardial kontraktilitenin deprese olduğunu göstermiştir (94).

Olası Tedavi Yaklaşımları

Giderek artan miktarda veri, TLR2 VE TLR4'ün kritik hastalıkla ilişkili deneysel düzeyde organ disfonksiyonuna neden olduğunu göstermektedir. Bunlar içinde sepsis, travma, hiperoksi ve iskemi reperfüzyon hasarı yer almaktadır.

Ancak bazı temel sorular cevapsız kaldığından TLR2 veya TLR4 modülasyonu üzerinden etki gösterecek tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi şu anda mümkün gözüküyor. Artan sayıda nonmikrobiyal ligandın TLR2 ve TLR4 yoluyla hücre aktivasyonu başlattığı gösterilmiştir. Çalışmalarda bu tip ligandların TLR2 ve TLR4 ile yaptığı komplekslerin yapısı ve bu etkileşimler ile indüklenen proinflamatuvar sinyallerin etkili şekilde durdurulması üzerinde durulmaktadır.

Hemoglobinin içindeki hem molekülünün TLR4 ile etkileşimi sonrası ortaya çıkan inflamasyon MD-2'den bağımsız iken hiyalüronik asitin küçük fragmanları ile oluşan inflamasyon ise CD14 bağımsızdır (Tablo 1). Bu tip bulgular TLR4 ve muhtemelen TLR2'nin, PAMP'lar tarafından kullanılan mekanizmalardan farklı şekillerde aktive olabildiklerini göstermektedir. Hücre aktivasyonunun bu yolları üzerine spesifik farmakolojik girişimler kritik hastalıklara yol açan patolojik inflamatuvar süreçleri azaltırken, TLR2 ve TLR4'ün immün sistemdeki yararlı etkilerini değiştirmeyecektir. Septik olmayan TLR2 veya TLR4 bağımlı organ disfonksiyonu modülasyonunda etkili olabilecek terapötik stratejiler reseptör agonistleri, reseptör antagonistleri ve sinyal transdüksiyon inhibitörlerini içerir.

İskemi reperfüzyon veya travma ile TLR4'ün indüklediği organ disfonksiyonu arasındaki ilişki, TLR4 ilişkili hücre aktivasyonunun baskılanmasının klinik sonuçları iyileştirebileceğini düşündürmektedir. TLR2 ve TLR4'ün rol oynadığı septik olmayan kritik hastalıklarda, TLR2 ve TLR4 ile indüklenen yolların erken evrelerini hedef alan ligand spesifik girişimler tedavide faydalı olabilir. Örneğin TLR'lerin tanımlanmasından önce bile gram negatif sepsis ve endotoksemi tedavisinde lipid A antagonistleri geliştirilmekteydi. TLR4 aktivasyonunu inhibe eden ve bir lipid A analogu olan E5564'ün (eritoran) günümüzde sepsis ile ilgili klinik çalışmalarda etkinliği araştırılmaktadır (32). Farelerde miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde E5564 kullanımı, enfarkt boyutunu azaltmış ve transkripsiyonu NF- κ B bağımlı olan proinflamatuvar sitokinlerin üretimini de baskılamıştır (95). E5564 aynı zamanda TLR4 ile fibronektin EDA arasındaki etkileşimi de antagonize eder (96). Bu çalışmalar E5564'ün TLR4'ün rol oynadığı sepsis ve endotoksemi dışındaki diğer klinik durumlarda da kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Lipid A analoglarına benzer şekilde, Lactobacillus plantarum lipoteikoik asit gibi lipoteik asit analogları da TLR2 ilişkili sinyal transdüksiyonunu inhibe eder. Lactobacillus plantarum lipoteikoik asit aynı zamanda Staphylococcus aureus ile karşılaşan hücrelerde TLR2 üzerinden ortaya çıkan TNF- α üretimini de bozmaktadır (97). Benzer şekilde TLR2 antagonisti olan yeni sentetik fosfolipidler sentezlenmiştir, ancak bunların kritik hastalıklarda kullanılmasına ilişkin deneysel çalışma verileri bulunmamaktadır (98). Spesifik peptidler, küçük moleküller veya antikolar kullanarak ligand ve reseptör arasındaki ilişkinin bozulması, sinyal iletiminin ve hücre aktivasyonunun bozulması için klasik bir yoldur. Hücre

membranı ve TLR4 ilişkisi ile ksantin oksidaz salıverilmesine neden olan heparinin, TLR4 ilişkili intraselüler sinyal mekanizmalarının süperoksit bağımlı aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, heparinin, hemoraji veya intestinal iskemi gibi dolaşımında ve hücre içinde artmış miktarlarda bulunan ksantin oksidazın bulunduğu patofizyolojik durumlarda, inflamasyon ve organ disfonksiyonunu azalttığını göstermektedir. Heparinin, ksantin oksidaz ilişkili TLR4 aktivasyonunu azaltabilmesi, antikoagülan etkilerinden bağımsız olarak, heparinin sepsiste faydalı olabileceğini göstermektedir (55). Buna ek olarak, hücre yüzeyine ksantin oksidaz heparan sülfat zincirleri yoluyla bağlandığından, ksantin oksidazın glikozaminoglikanlara bağlandığı bölgeyi bloke eden peptidler, aynı zamanda TLR4 ile ksantin oksidaz arasındaki etkileşimi de bozabilmektedir. Bu tip peptidlerin potansiyel yararı, bakteriyel enfeksiyonlara karşı konak savunmasını bozmadan, ksantin oksidaz ilişkili süperoksitin proinflamatuvar etkilerini bloke edebilmesidir. Benzer olarak, TLR4'ün TIR parçası ile NADPH oksidaz alt ünitelerinin etkileşimlerinin bloke edildiği spesifik tedaviler sonucunda, iskemi reperfüzyonda TLR4 bağımlı inflamasyonda azalma gerçekleşebilir. Hemoglobinin içindeki hem molekülü gibi MD-2 olmadan TLR4 ilişkili hücrel aktivasyonu aktive eden ligandlar, protoporfirin IX gibi küçük moleküller aracılığı ile TLR4'den ayrılabilir. Böylece, enfeksiyona karşı yararlı immün yanıtları inhibe etmeden, proinflamatuvar etkileri azaltabilmektedirler (65).

TLR2'nin ekstraselüler parçasına karşı oluşan antikoların, TLR2 ligandları ile karşılaşmış farelerde mortaliteyi azaltabildiği gösterilmiştir (99). Bu antikordan T2.5, lipoteikoik asidin TLR2'ye bağlanmasına engel olur. Bu bulgular, anti-TLR2 antikolarının, TLR2 bağımlı septik olmayan inflamasyon ve organ disfonksiyonunda yararlı olabileceğini ortaya koymaktadır.

TLR2 veya TLR4 ilişkili intraselüler yolların modülasyonunu hedef alan moleküler yaklaşımlar günümüzde araştırma aşamasındadır. Örneğin, sikloheksen türevi olan TAK-242, TLR4'ün küçük sentetik bir inhibitörüdür. TLR4'ün intraselüler parçasındaki Cys747 molekülüne bağlanarak bu inhibisyonu gerçekleştirir (100). TAK-242, TLR4 ilişkili TRIF yolağını ve MyD88 bağımlı yolağı inhibe eder (100). TRAM'in yeni bir varyantı olan TAG (TRAM adapter with gold domain), MyD88 bağımsız sinyal yolağını TRIF ve TRAM arasındaki ilişkiyi bozarak spesifik olarak inhibe eder (101).

TLR2/TLR6 heterodimerinin ve MD2 ile eşleşmiş TLR4 homodimerinin kristal yapısının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması ile, mikrobiyal olmayan ligandların TLR2 ve TLR4'e nasıl bağlandıklarını açıklamak mümkün olmuştur. Bu dimerlerin mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan ligandlar ile etkileşiminin tam anlaşılması ile TLR2 ve TLR4'ün aktivasyonu ve bu reseptörler yoluyla aşırı sinyal yollarının inhibisyonu ile ilgili yeni bakış açıları ortaya konmaktadır. Kristallografi ve ilişkili fonksiyonel çalışmalar, DAMPs ve diğer mikrobiyal olmayan TLR2 veya TLR4 ligandlar ile gerçekleşen hücrel

aktivasyonun, konak savunma mekanizmalarını bozmadan nasıl düzenlenebileceği ile ilgili yeni yaklaşımlar sunmaktadır.

Bu derlemede bahsedilen ligandlar dışında, kritik hastalarda TLR2 ve TLR4 aracılı septik olmayan inflamasyona katkıda bulunabilen başka ligandlar da vardır. Örneğin, etanol ve asetaminofen ilişkili karaciğer hasarında, ventilatör ilişkili ve aspirasyon ilişkili akciğer hasarında ve hayatı tehdit eden astım alevlenmesinde de TLR2 ve TLR4'ün rol oynadığı bilinmektedir.

Sonuç

Bu derlemede tartışılan veriler, TLR2 ve TLR4'ün sadece bakteriyel enfeksiyonlar ile değil, aynı zamanda kritik hastalık patofizyolojisindeki mekanizmalarla da aktive olabileceğini göstermektedir. TLR2 ve TLR4'ün ROS ve enfeksiyon ile ilişkili olmayan diğer mekanizmalar ile aktive olması, enfeksiyöz nedenler ile ilişkili olan mekanizmalardan farklıdır. Ayrıca farklı gen aktivasyonları ve proinflamatuvar mediatörlerin salıverilmesi söz konusudur. TLR2, TLR4 ve diğer TLR'ler ile enfeksiyöz olmayan mediatörler arasındaki ilişkiler ve bunların kritik hastalardaki patofizyolojik önemlerini anlamak için gelecekte yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

TLR2 ve TLR4 yoluyla, ROS, hiyalüronik asit fragmanları, HMGB1 ve diğer enfeksiyöz olmayan mediatörlerin akut inflamatuvar süreçler ve organ disfonksiyonuna katkıda bulunabilmesi, yoğun bakım hastalarındaki tedavi yaklaşımları için önemlidir. TLR2 veya TLR4 ile spesifik ligandlar arasında oluşan kompleksler veya TLR2 veya TLR4 ilişkili intraselüler sinyal mekanizmalarını hedef alan terapötik yaklaşımlar, sadece sepsiste değil, aynı zamanda travma, kanama gibi enfeksiyonun rol oynamadığı patofizyolojik durumlarda da yararlı olabilir. Gelecekte yapılacak olan yeni deneyler ve klinik çalışmalar bu hipotezlerin tedaviye yansıtılması için gereklidir.

Kaynaklar

1. Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1994;1:27-35.
2. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996;32:486-8.
3. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
4. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-8.
5. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-96.
6. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.

7. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, et al. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 1996;184:1413-24.
8. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161:1083-6.
9. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188:373-86.
10. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *J Clin Immunol* 2000;20:161-6.
11. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000;164:558-61.
12. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
13. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999;189:615-25.
14. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000;165:618-22.
15. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2:346-52.
16. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-51.
17. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, et al. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2-and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000;164:554-7.
18. Glickman MS, Jacobs WR Jr. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. *Cell* 2001;104:477-85.
19. Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, Gay NJ. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:8-14.
20. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-3.
21. Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, et al. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 1996;4:407-14.
22. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000;275:2251-4.
23. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-82.
24. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:219-32.
25. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997;278:1612-5.
26. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998;2:253-8.
27. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997;7:837-47.
28. Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998;273:12203-9.
29. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1-and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998;9:143-50.
30. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
31. Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, Thomas JA. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000;164:4301-6.
32. Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, Kawata T, Kimura A, Kobayashi S, et al. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1093-102.
33. Rossignol DP, Lynn M. TLR4 antagonists for endotoxemia and beyond. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6:496-502.
34. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007;76:141-65.
35. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003;3:466-77.
36. McGettrick AF, O'Neill LA. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol Immunol* 2004;41:577-82.
37. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 1988;242:540-6.
38. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003;198:1043-55.
39. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002;3:667-72.
40. Barsness KA, Arcaroli J, Harken AH, Abraham E, Banerjee A, Reznikov L, et al. Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4 dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R592-9.
41. Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004;109:784-9.
42. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007;117:2847-59.
43. Benhamou Y, Favre J, Musette P, Renet S, Thuillez C, Richard V, et al. Toll-like receptors 4 contribute to endothelial injury and inflammation in hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med* 2009;37:1724-8.
44. Favre J, Musette P, Douin-Echinard V, Laude K, Henry JP, Arnal JF, et al. Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1064-71.
45. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, Rouschop KM, Teske GJ, Kirschning CJ, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* 2005;115:2894-903.

46. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, Roelofs JJ, van der Poll T, Florquin S, et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 2008;3:e3596.
47. Shigeoka AA, Holscher TD, King AJ, Hall FW, Kiosses WB, Tobias PS, et al. TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 2007;178:6252-8.
48. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* 2007;35:2408-16.
49. Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Collier B, Doerschuk CM, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1027-35.
50. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 2003;17:287-96.
51. Schwartz MD, Repine JE, Abraham E. Xanthine oxidase-derived oxygen radicals increase lung cytokine expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:434-40.
52. Bowler RP, Arcaroli J, Abraham E, Patel M, Chang LY, Crapo JD. Evidence for extracellular superoxide dismutase as a mediator of hemorrhage-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L680-7.
53. Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Guo Y, French BA. Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:1893-8.
54. Bowler RP, Arcaroli J, Crapo JD, Ross A, Slot JW, Abraham E. Extracellular superoxide dismutase attenuates lung injury after hemorrhage. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:290-4.
55. Lorne E, Zmijewski JW, Zhao X, Liu G, Tsuruta Y, Park YJ, et al. Role of extracellular superoxide in neutrophil activation: interactions between xanthine oxidase and TLR4 induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C985-93.
56. Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* 2004;173:3589-93.
57. Yang CS, Shin DM, Kim KH, Lee ZW, Lee CH, Park SG, et al. NADPH oxidase 2 interaction with TLR2 is required for efficient innate immune responses to mycobacteria via cathelicidin expression. *J Immunol* 2009;182:3696-705.
58. Cobb JP. Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: a decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)* 2001;2:93-100.
59. Powers KA, Szaszi K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, et al. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med* 2006;203:1951-61.
60. Murray LA, Knight DA, McAlonan L, Argentieri R, Joshi A, Shaheen F, et al. Deleterious role of TLR3 during hyperoxia-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1227-37.
61. Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, et al. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 2008;205:2609-21.
62. Letarte PB, Lieberman K, Nagatani K, Haworth RA, Odell GB, Duff TA. Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells. *J Neurosurg* 1993;79:252-5.
63. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int* 2001;59:106-17.
64. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002;100:879-87.
65. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2007;282:20221-9.
66. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;195:99-111.
67. Agren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic Biol Med* 1997;23:996-1001.
68. Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, Di Nardo A, Goodarzi H, Golenbock D, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J Biol Chem* 2007;282:18265-75.
69. Teriete P, Banerji S, Noble M, Blundell CD, Wright AJ, Pickford AR, et al. Structure of the regulatory hyaluronan binding domain in the inflammatory leukocyte homing receptor CD44. *Mol Cell* 2004;13:483-96.
70. Wang Q, Teder P, Judd NP, Noble PW, Doerschuk CM. CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in *Escherichia coli* pneumonia in mice. *Am J Pathol* 2002;161:2219-28.
71. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, et al. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 2002;296:155-8.
72. Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med* 2005;11:1173-9.
73. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-51.
74. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.
75. Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol* 2008;180:2531-7.
76. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007;8:487-96.
77. Ulloa L, Batliwalla FM, Andersson U, Gregersen PK, Tracey KJ. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokine, and potential therapeutic target in arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:876-81.
78. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, et al. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock* 2009;32:17-22.
79. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000;165:2950-4.
80. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:296-301.
81. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C917-24.
82. Asea A, Rehli M, Kablinger E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277:15028-34.
83. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 2001;276:31332-9.

84. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002;295:1852-8.
85. Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 1999;79:425-49.
86. Qian SB, McDonough H, Boellmann F, Cyr DM, Patterson C. CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* 2006;440:551-5.
87. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000;12:1539-46.
88. Asea A. Mechanisms of HSP72 release. *J Biosci* 2007;32:579-84.
89. Pittet JF, Lee H, Morabito D, Howard MB, Welch WJ, Mackerles RC. Serum levels of Hsp 72 measured early after trauma correlate with survival. *J Trauma* 2002;52:611-7.
90. Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steensberg A, Keller C, Krstrup P, et al. Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans. *J Physiol* 2002;544:957-62.
91. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009;85:905-10.
92. Osterloh A, Veit A, Gessner A, Fleischer B, Breloer M. Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. *Int Immunol* 2008;20:433-43.
93. Galloway E, Shin T, Huber N, Eismann T, Kuboki S, Schuster R, et al. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C514-20.
94. Zou N, Ao L, Cleveland JC Jr., Yang X, Su X, Cai GY, et al. Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2805-13.
95. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006;114:1270-4.
96. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276:10229-33.
97. Kim HG, Lee SY, Kim NR, Ko MY, Lee JM, Yi TH, et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor-alpha production. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:1191-6.
98. Spyvee MR, Zhang H, Hawkins LD, Chow JC. Toll-like receptor 2 antagonists. Part 1: preliminary SAR investigation of novel synthetic phospholipids. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:5494-8.
99. Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, et al. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004;113:1473-81.
100. Takashima K, Matsunaga N, Yoshimatsu M, Hazeki K, Kaisho T, Uekata M, et al. Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol* 2009;157:1250-62.
101. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, et al. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol* 2009;10:579-86.