

Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario

C. Moreno, A. Sánchez-Ibarrola

Servicio de Inmunología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

Correspondencia:

Dr. Sánchez-Ibarrola

Servicio de Inmunología. Clínica Universitaria

Avda. Pío XII, 36

31080 Pamplona

(asanchezib@unav.es)

Resumen

Los microorganismos patógenos presentan en su superficie una serie de patrones moleculares comunes y constantes que son reconocidos por una gran variedad de receptores (PRR), entre los más importantes, hay que destacar una familia de proteínas transmembrana conocidos con el nombre de "receptores similares a Toll" (TLR).

Los TLR son receptores reconocedores de patrones que tienen un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria. El TLR4, receptor del LPS de bacterias Gram negativas, es el miembro de la familia TLR mejor caracterizado. Hasta el momento, se han identificado diez miembros de la familia de "receptores similares a Toll" (TLR1-TLR10).

Estudios recientes, han demostrado que alteraciones a nivel de los TLR parecen estar en la base de trastornos patológicos como la sepsis. Un mayor conocimiento de los TLR permitirá establecer terapias adecuadas para la sepsis y otras enfermedades de carácter inmunológico.

Palabras claves: Toll. "Receptores tipo Toll". PAMP. PRR. LPS.

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa que impide la invasión y diseminación de los patógenos. Las células del sistema inmune innato reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), a través de los receptores conocidos como receptores reconocedores de patrones (PRR). Los PRR se expresan fundamentalmente en la superficie de las células que primero entran en contacto con el patógeno durante la infección (células de la superficie epitelial) y en células presentadoras de antígeno (células dendríticas y monocitos/macrófagos); también se encuentran presentes en compartimentos intracelulares, en el torrente circulatorio y en fluidos tisulares.

Entre los principales PAMPs que actúan como dianas para la activación del sistema inmune innato se encuentran el lipopolisacárido, ácido teicoico, secuencias de DNA CpG no metiladas, manosa y RNA bicatenario característico de virus. Estos patrones moleculares presentes en los microorganismos patógenos presentan una serie de propiedades comunes:

- Son característicos de los microorganismos y no se encuentran presentes en las células del huésped, característica que permite al sistema inmune innato distinguir entre antígenos propios y extraños.

Summary

Microbes have on their surface molecular patterns that are common among a broad range of pathogens. These patterns are recognized by a wide variety of cellular receptors, the most important of which are a family of transmembrane proteins termed "Toll-like receptors" (TLR). TLRs are pattern-recognition receptors that have key roles in detecting pathogens and initiating inflammatory responses.

The receptor of Gram negative bacterial LPS, TLR4, is the best characterized member of the TLR family. So far, ten mammalian Toll-like receptors (TLR1-TLR10) have been identified. Recent studies revealed that the TLR signaling pathway is a critical mediator of sepsis. An understanding of TLRs and their signaling pathway will reveal a therapeutic target in sepsis and other immune mediated diseases.

Key words: Toll. "Toll like receptor". PAMP. PRR. LPS.

- Son invariables, lo que permite que con un número limitado de PRR se detecte la presencia de cualquier patógeno. Ej: el reconocimiento del lípido A característico del LPS permite a un único PRR detectar la presencia de cualquier infección bacteriana por gram negativo.
- Son esenciales para la supervivencia o patogenicidad del patógeno por lo que sus mutaciones son letales para el microorganismo y por tanto permanecen invariables pudiendo ser reconocidos por los PRR.

Hay distintos tipos de proteínas que presentan características de PRR capaces de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos, entre los cuales, hay que destacar los "receptores similares a Toll" (TLR). Los macrófagos y las células dendríticas pueden usar sus "receptores similares a Toll" para clasificar al patógeno invasor y responder de forma personalizada. Los diez TLR conocidos hasta el momento, bien de forma individualizada o bien formando heterodímeros son capaces de reconocer prácticamente cualquier agente infeccioso.

La activación de los PRR a través de los PAMPs conlleva una doble función:

1. Activar distintos procesos característicos del sistema inmune innato, como puede ser la fagocitosis, opsoni-

zación, producción de mediadores de la inflamación, etc., con el fin de impedir la diseminación del patógeno antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida.

2. Establecer una conexión entre la inmunidad innata y adquirida.

Conexión entre la inmunidad innata y adquirida

Bacterias, virus y otros microorganismos son identificados como elementos extraños mediante el reconocimiento de sus patrones moleculares asociados a patógenos por la familia de proteínas TLR, presentes en las células presentadoras de antígeno. La respuesta que se produce tras la activación de los "receptores similares a Toll" en la célula presentadora de antígeno incluye un aumento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, de moléculas coestimuladoras como B7 y un aumento de la expresión de genes dependientes de NFκB como IL12, IL1, IL6 y TNFα.

La producción de IL12 junto con la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras, permite el desarrollo de los linfocitos T CD4 a Th1. La respuesta Th1 permite activar la propiedad microbicida de los macrófagos e inducen a los linfocitos B a producir anticuerpos IgG, efectivos para la opsonización de patógenos extracelulares.

Parásitos multicelulares y alérgenos parecen ser reconocidos a través de un sistema de receptores reconocedores de patrones independientes de TLR que conlleva el desarrollo de la respuesta Th2. Las células Th2 inician la respuesta inmunitaria humoral, provocando la activación de linfocitos B específicos de antígeno capaces de eliminar al patógeno, principalmente mediante la síntesis de IgE. Hay autores que consideran la respuesta Th2 como un fallo en la respuesta inmune, cuando los microorganismos no son capaces de estimular las células dendríticas para la producción de IL12 y otras citoquinas inductoras de respuesta Th1, se desarrolla la respuesta Th2¹⁻⁵.

En los últimos años, se ha avanzado mucho en el estudio de los TLR dada su gran importancia en el desarrollo de la respuesta inmune.

Descubrimiento de los receptores similares a Toll en *Drosophila Melanogaster*

La proteína Toll fue identificada como un componente esencial de la vía que establece el desarrollo dorso-ventral del embrión de *Drosophila Melanogaster*. Dos investigadores, Nüsslein-Volhard y Wieschaus (Premio Nobel por sus aportaciones en el estudio del desarrollo embrionario de *Drosophila*), estudiaron mutaciones letales que afectaban al desarrollo del cigoto de *Drosophila*. Encontraron una línea de embriones procedentes de hembras heterocigotas que presentaban una mutación en un gen que impedía el desarrollo del mesodermo y del sistema nervioso central. Identificaron el gen mutado y comprobaron que daba lugar a un receptor transmembrana que denominaron Toll^{6,7}. La activación de este receptor a través del ligando *spätzle*, inicia una cascada de señalización en la que intervienen una serie de proteínas (*tube*, *pelle*) que finalmente conlleva la degradación de la proteína *cactus* y la liberación de *dorsal*, la

cual, se puede traslocar al núcleo y activar o reprimir la expresión de genes que intervienen en el desarrollo embrionario de *Drosophila* (8,9). Posteriormente, se descubrió que la proteína Toll tiene un papel central en la respuesta inmune de la *Drosophila* adulta, la vía de señalización de Toll es necesaria para inducir la transcripción de un gen que da lugar a un péptido antifúngico denominado drosomicina en respuesta a una infección por hongos. En estudios posteriores se observó que moscas adultas con mutaciones en el gen Toll eran incapaces de inducir la expresión del péptido drosomicina cuando eran infectados con *Aspergillus fumigatus*. Estos mutantes no eran susceptibles a infecciones bacterianas, lo que sugería que la respuesta antibacteriana y la respuesta antifúngica seguían distintas vías de señalización. En la actualidad se han encontrado nueve miembros de la familia Toll en *Drosophila* entre los que se encuentran receptores capaces de reconocer componentes bacterianos como la proteína de la familia Toll presente en *Drosophila* denominada 18-Wheeler¹⁰ (Tabla 1).

Receptores similares a Toll en Mamíferos

Recientemente se han identificado en plantas y en mamíferos una serie de proteínas con homología a la proteína Toll de *Drosophila* y que reciben el nombre de "receptores similares a Toll" (TLR)^{11,12}.

La proteína Toll de *Drosophila* y los TLRs presentes en plantas y mamíferos son proteínas transmembrana tipo I que presentan un dominio extracelular con segmentos repetidos¹⁸⁻³¹ ricos en leucina (LRRs) y un dominio citoplasmático muy conservado con homología con el dominio citoplasmático del receptor de la interleukina 1, denominado dominio TIR^{13, 14}.

En los últimos años, miembros de la familia TLR han sido clonados y su distribución en las distintas especies indica que el sistema de señalización de TLR está altamente conservado. Actualmente se han descrito diez miembros de la familia "receptores tipo Toll" en mamíferos, su distribución en los distintos tejidos ha sido estudiada y se ha comprobado que una gran variedad de células expresan receptores similares a Toll de *Drosophila*, principalmente se encuentran presentes en células mieloides, miocitos cardiacos, células endoteliales y linfocitos T gamma/delta¹⁵⁻¹⁷.

Al estudiar los dominios extracelulares de las proteínas de la familia Toll se ha observado que son dominios muy divergentes, comparando TLR2 y TLR4, su homología es del 24%, lo que explicaría su activación por distintos ligandos. Esta diferencia se hace patente también entre genes homólogos de diferentes especies, por ejemplo, el TLR4 de ratón presenta una homología del 53% con el TLR4 humano. A diferencia del dominio extracelular, el dominio citoplasmático está bastante conservado a lo largo de la evolución, el TLR4 humano y del ratón presentan una homología del 83%^{6,18}.

TLR4: componente del receptor multimérico de LPS

El TLR4 es el miembro de la familia Toll que primero se identificó en mamíferos y el que mejor se ha caracterizado²⁹. Forma parte del receptor multimérico del LPS en monocitos

Tabla 1. Funcionalidad de los TLRs

TLR	Ligando	Expresión celular
TLR1	Modulina y lipopéptidos de bacterias gram (+) (26)	Monocitos, neutrófilos, LB,NK
TLR2	Lipoproteínas, peptidoglicano y ácido teicoico de gram (+) Modulina de <i>Staphylococcus</i> Zymosan (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) LPS de <i>Leptospira interrogans</i> LPS de <i>P. Gingivalis</i> Lipoarabinomanano de <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> Proteínas GPI de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Monocitos, neutrófilos y células dendríticas
TLR3	RNA bicatenario viral (19)	Células dendríticas
TLR4	LPS de bacterias gram (-) Taxol Hsp60, Hsp70 (21) Dominio EDA de la fibronectina Proteína F del virus respiratorio sincitial	Monocitos, células endoteliales, neutrófilos y células dendríticas
TLR5	Flagelina (22)	Monocitos, células dendríticas
TLR6	Lipoproteínas (24-26) Cofactor de TLR2	Monocitos, células dendríticas
TLR7	Compuestos antivirales (27, 28)	Leucocitos, células dendríticas
TLR8	Compuestos antivirales (28)	Leucocitos, células dendríticas
TLR9	Secuencias CpG de DNA bacteriano (23)	Monocitos, células dendríticas, LB
LR10	Desconocido	Linfocitos B

humanos. El LPS es uno de los principales componentes de la superficie externa de bacterias gram negativas y constituye un potente activador de células de los sistemas inmune e inflamatorio incluyendo macrófagos, monocitos y células endoteliales³⁰. El papel clave del TLR4 en la respuesta a LPS se confirmó cuando en 1978 se mapeó en el cromosoma 4 del ratón una mutación histidina por prolina en el dominio citoplasmático, que afectaba a un único locus confiriendo resistencia al LPS en esta cepa C3H/HeJ, este locus se denominó *Lps^d*. En estudios posteriores se encontró solamente un único gen en la región *Lps^d*, el gen TLR4, que además estaba mutado en dicha cepa de ratones. Deleciones del gen TLR4 confirmaron su importancia en la activación por LPS³¹.

El receptor del LPS se ha descrito como una estructura compleja con una molécula reconocedora CD14, y un complejo señalizador (TLR4/MD2).

La molécula CD14 es una proteína anclada a la membrana a través de un resto glicosilfosfatidilinositol pero carece de dominio citoplasmático por lo que no puede transmitir la señal al interior celular, el CD14 une LPS y lo libera hacia el complejo TLR4/MD2. La molécula MD2 es una proteína asociada al dominio extracelular del TLR4 y aumenta la afinidad de este complejo por el LPS. Recientemente, Golenbock y colaboradores han descrito en una línea celular de ovario de hámster (CHO) una mutación en una región conservada de la proteína MD2 que impide la activación por LPS en dichas células. La expresión en estas células de MD2 no mutado devuelve la sensibilidad a LPS, por tanto, al menos, para la detección de LPS, TLR4 requiere de MD2^{32,33}.

Ulevith y colaboradores realizaron unos experimentos en los que observaron como el LPS se liberaba desde el CD14 y se

situaba próximo al complejo TLR4/MD2 lo que sugería unión con LPS^{34,35}. Se piensa un modelo en el cual el complejo TLR4/MD2 reconoce de forma específica al ligando, es decir, tiene lugar una discriminación dependiente de la estructura del ligando³⁶. El taxol es un anti mitótico que es capaz de inducir activación en células de ratón por la misma vía que el LPS. Esta activación se ha visto que no es posible en ratones C3H/HeJ ni en ratones con deleciones del TLR4, lo que indica que el TLR4 participa en la detección del taxol. En células humanas no es posible la activación de la vía de señalización del TLR4 a través del taxol, pero se ha visto que células humanas que co-expresan TLR4/MD2 de ratón son capaces de responder a taxol. Todos estos estudios parecen confirman la unión del LPS al complejo TLR4/MD2 y la capacidad de este complejo de distinguir variantes estructurales del LPS según la especie^{20,37}.

Vía de señalización de TLRs

La unión del LPS a la porción externa del receptor TLR4 induce al dominio TIR (dominio citoplasmático con homología al dominio citoplasmático de IL1-R) a unirse y activar una proteína adaptadora conocida como MyD88³⁸. En un extremo, la proteína MyD88 presenta un dominio TIR a través del cual interacciona con el dominio TIR de TLR4, en el otro extremo posee un dominio que media las interacciones proteína-proteína conocido como dominio muerte (DD). Este dominio muerte se encontró por primera vez en proteínas implicadas en "la muerte celular programada". MyD88 a través de este dominio muerte interacciona con otro dominio muerte de la quinasa IRAK (quinasa asociada a IL1-R). Esta proteína inicia una cascada de

activación de kinasas a través de las cuales dos kinasas IKK α e IKK β se activan formando un dímero IKK que fosforila una proteína de inhibición conocida como I κ B. En condiciones basales I κ B se une con NF κ B en un complejo citosólico e inhibe su traslocación al núcleo. Tras la eliminación de I κ B, NF κ B entra en el núcleo y activa la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria a LPS como TNF- α , IL1 β , IL6^{6,13,16}.

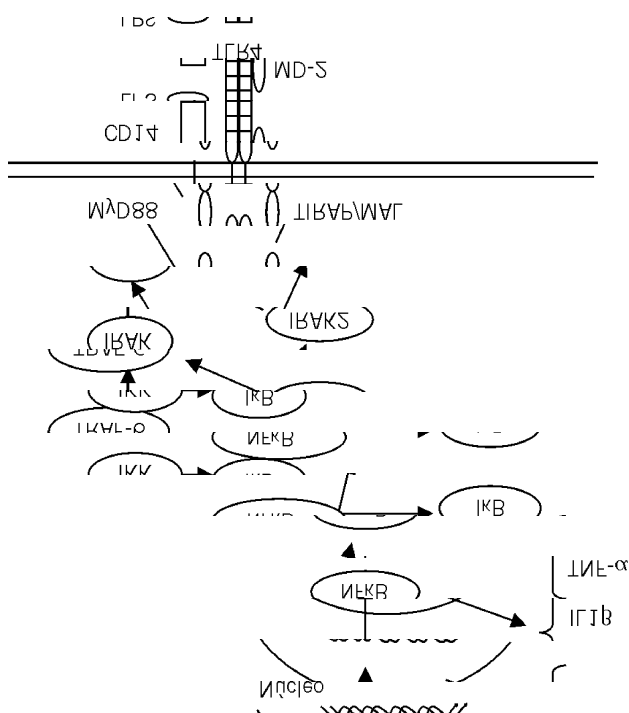
Estudios con ratones knock-out para MyD88 indican que la vía de señalización para LPS a través de TLR4 puede ser independiente de MyD88, recientemente se ha identificado una segunda proteína adaptadora; conocida como TIRAP (proteína adaptadora con dominio TIR) o también llamada Mal (MyD88-adaptador-like) la cual funciona como una proteína adaptadora para TLR4 capaz de inducir la traslocación de NF κ B al núcleo por una vía independiente a la de MyD88³⁹ (Figura 1).

Importancia clínica y futuras aplicaciones

En los últimos años, el estudio de los "receptores tipo Toll", está permitiendo aclarar algunos aspectos poco conocidos de la activación de la respuesta inmune innata y su conexión con la inmunidad adaptativa. Hasta el momento se han encontrado diez receptores del tipo TLR aunque todavía se desconocen muchos de los ligandos de estos receptores. Alteraciones funcionales a nivel de los TLRs parece que están en la base de trastornos patológicos como la sepsis⁴⁰⁻⁴⁴.

El problema sanitario que supone la sepsis por Gram negativos y las consecuencias fisiopatológicas que se derivan, son una prioridad clínica en distintos campos de la medicina. En Estados Unidos aproximadamente 200000 personas fallecen cada año por este tipo de complicaciones. Si mutaciones en los

Figura 1. Vía de señalización de TLR4



TLRs están implicados en estos procesos patológicos, en un futuro, se podría predecir el riesgo de un paciente de desarrollar sepsis mediante un sencillo análisis genético, reduciendo considerablemente el fallecimiento por este tipo de infecciones.

Algunos autores han propuesto una posible relación entre el desarrollo de enfermedades autoinmunes y diferentes polimorfismos de TLRs, futuras investigaciones en este campo, permitirán conocer los mecanismos moleculares de la activación del sistema inmune y por tanto, explicar muchas de las patologías que tienen como base el sistema inmunológico.

Bibliografía

1. Medzhitov R, Janeway Ch. Innate immunity: impact on the immune response. *Curr. Opin. Immunol* 1997;9:4-9.
2. Medzhitov R, Barton G. Control of adaptative immune responses by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol* 2002;14:380-3.
3. Jankovic D, Liu Z, Gause W. Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol* 2001;22:450-7.
4. Rook G. Th1 or Th2 cell commitment during infectious disease: an oversimplification? *Trends Immunol* 2001;22:481.
5. Imler J, Hoffmann J. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol* 2001;11:304-11.
6. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol* 2000;12:13-9.
7. Lien E, PhD, Robin R, Ingalls MD. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002;30:(Suppl.):S1-S11.
8. Wasserman SA. Toll signaling: the enigma variations. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:497-502.
9. Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Science* 2000;68:241-58.
10. Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, et al. The 18-Wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *Embo J* 1997;16:6120-3130.
11. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:588-93.
12. Brightbill HD, Moddin RL. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunol* 2000;101:1-10.
13. Undeerhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 2002;14:103-10.
14. Katherine A, Fitzgerald Luke AJ, O'Neill. The role of the interleukin-1/ Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defense. *Microbes Infect* 2000;2:933-43.
15. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:625-35.
16. Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors. *Microbes Infect* 2000; 2:251-5.
17. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, et al. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2000;28:563-6.
18. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai 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.
19. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF κ B by toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-38.
20. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, et al. Mouse Toll-like receptor 4 MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by taxol. *J Biol Chem* 1999;275:2251-4.
21. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000;164:558-61.

22. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
23. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.
24. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13:933-40.
25. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. TLR6: A novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene* 1999;231:59-65.
26. Hajjar AM, O' Mahony DS, Ozinsky A, et al. Functional interactions between toll-like receptor (TLR2) and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001;166:15-19.
27. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.
28. Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002;3:499.
29. Beutler B. TLR4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000;12:20-6.
30. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* 2001;13:85-94.
31. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-52.
32. Schromm AB, Lien E, Henneke P, et al. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001;194:79-88.
33. Dziarski R, Wang Q, Miyake K, et al. MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2) - mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2- mediated responses to gram-positive and gram-negative bacteria and their cell wall components. *J Immunol* 2001; 166:1938-44.
34. Jiang O, Akashi S, Miyakem K, Petty H. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kB. *J Immunol* 2000; 165:3541-4.
35. Correia J, Soldau K, Christen U, et al. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. *J Biol Chem* 2001;276:21129-21135.
36. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-82.
37. Lien E, Means TK, Heine H, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000;105:497-504.
38. Chows JC, Young DW, Golenbock DT, et al. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10689-92.
39. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP, an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2:835-41.
40. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-9.
41. Qureshi S, Lariviere L, Leveque G, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Exp Med* 1999;189: 615-25.
42. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, et al. Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4 -MD2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000;164: 3471-5.
43. Medvedev A, Henneke P, Schromm A, et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and Mycobacterial components in chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptor 2 or 4. *J Immunol* 2001;167:2257-67.
44. Medvedev A, Kopydlowski K, Vogel S. Inhibition of lipopolysaccharide induced signal transduction in endotoxin tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and Toll like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164:5564-74.