

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jonáš Prokop

**Signální systémy TLR receptorů v mikroglích**

Signal systems of TLR receptor in microglia

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 14.08.2020

**Poděkování**

Děkuji mému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné konzultace, trpělivost, a hlavně drahocenný čas, který mi věnoval při vypracování této práce. Velké díky za podporu a trpělivost patří také mé rodině a blízkým.

## **Abstrakt**

Ve výzkumu onemocnění centrální nervové soustavy stále více vyvstává význam TLR dependentní signalizace v mikroglíích. Jak MyD88 závislá, tak TRIF závislá dráha, které využívají TLR, vyvolávají sekreci prozánětlivých cytokinů aktivací transkripčních faktorů, například NF- $\kappa$ B. Tato exprese následně polarizuje celou mikrogliaální populaci do prozánětlivého fenotypu. Za fyziologických podmínek exprimují mikroglie řadu protizánětlivých a růstových faktorů a účastní se údržby CNS. Jakmile se aktivují do prozánětlivého fenotypu, jsou spojeny se zánětem a v případě přílišné aktivace také s neurodegenerací. Výzkum signálních systémů TLR v mikrogliaálních populacích je klíčový pro pochopení komplexních patologií nervového systému, a přesná znalost asociovaných mechanismů se může ukázat velmi užitečnou v navrhování nových terapeutických přístupů.

**Klíčová slova: Mikroglie, signální systémy Toll-like receptorů, Myd88, TRIF, neuroinflamace, neurodegenerace**

## **Abstract**

Emerging importance of TLR signalling in microglia has been suggested by various studies of neuroinflammation. Both MyD88 dependent and TRIF dependent pathways used by TLR induce secretion of proinflammatory cytokines in microglia by the activation of transcriptional factors such as NF- $\kappa$ B. This in turn polarizes the whole microglial population to a proinflammatory phenotype. Under physiological conditions microglia express various anti-inflammatory and growth factors and serve in the maintenance of the CNS. Once activated, microglia are connected to neuroinflammation and in the case of overactivation to neurodegeneration. Research of TLR signalling in microglial populations is important for our understanding of complex pathologies of the central nervous system. Moreover, exact knowledge of associated mechanisms might prove very useful in finding new therapeutic approaches.

**Key words: Microglia, signalling systems of toll-like receptors, Myd88, TRIF, neuroinflammation, neurodegeneration**

## Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Mikroglie.....	1
3.	Signální systémy TLR receptorů.....	5
3.1.	Asociované signální molekuly.....	5
3.2.	Asociované transkripční faktory.....	7
3.3.	MyD88 dependentní signalizace .....	10
3.4.	TRIF dependentní signalizace .....	11
4.	Toll-like receptory.....	13
4.1.	TLR 1,2,6,10.....	15
4.2.	TLR 3.....	15
4.3.	TLR 4.....	15
4.4.	TLR 5.....	16
4.5.	TLR 7,8,9.....	16
4.6.	Regulace TLR signalizace .....	16
5.	Patologie se zapojením mikroglálních TLR.....	17
6.	Závěr.....	18
7.	Reference.....	19

## Užité zkratky

A	adenin
Aa	aminokyselina (aminoacid)
AML1	protein 1 akutní myeloidní leukémie (acute myeloid leukemia 1 protein)
AP – 1	aktivační protein 1
APC	antigen prezentující buňka (antigen presenting cell).
ASK1	kináza regulující signalizaci apoptózy (apoptosis signal-regulating kinase 1)
BAFFR	receptor B buňku aktivujícího faktoru (B-cell activating factor receptor)
Bcl-3	protein kódovaný nádorem B-buněk (B-cell lymphoma 3-encoded protein)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor)
bZIP	základní doména leucinového zipu (basic zipper leucine domain)
C	cytosin
CBP	protein vázající CREB (CREB binding protein)
CD45	tyrozinová fosfatáza CD45 (protein tyrosine phosphatase, receptor type C)
c-kit	růstový faktor žírných buněk (mast cell growth factor receptor)
CNS	centrální nervový systém
CREB	protein vázající element cAMP rychlé odpovědi (cAMP response element-binding protein)
CX <sub>3</sub> CR1	chemokínový receptor 1 (CX3C chemokine receptor 1)
CYLD	protein potlačující nádor z cylindromatosis (cylindromatosis tumor suppressor protein)
DD	mrtvá doména (death domain)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvoušroubovice DNA
dsRNA	dvoušroubovice RNA
DUBA	deubikvitinující enzym A (deubiquitinating enzyme A)
ERK	mimobuněčným signálem regulovaná kináza (extracellular signal regulated kinase)
F4/80	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
G	guanin
GDNF	z gliových buněk odvozený neurotrofní faktor (glial cell-derived neurotrophic factor)
GFAP	kyselý gliový fibrilární protein (glial fibrillary acidic protein)
GOLD	doména dynamiky Golgiho aparátu (Golgi dynamics domain)
IAD	s IRF asociovaná doména (IRF association domain)
ID	intermediární doména
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IKK	kináza inhibitoru jaderného faktoru $\kappa$ (I $\kappa$ B kinase)
IKK $\alpha$	kináza inhibitoru jaderného faktoru $\kappa$ $\alpha$
IKK $\beta$	kináza inhibitoru jaderného faktoru $\kappa$ $\beta$
IKK $\epsilon$	kináza inhibitoru jaderného faktoru $\kappa$ $\epsilon$
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10
IL-12	interleukin 12
IL-18R	receptor pro Interleukin 18
IL-1R	receptor pro interleukin 1 (interleukin-1 receptor)
IL-23	interleukin 23
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
IRAK	s IL-1 receptorem asociovaná proteinkináza (IL-1 receptor associated proteinkinase)
IRF3	regulační faktor interferonu 3 (interferon regulatory factor 3)
IRF5	regulační faktor interferonu 5 (interferon regulatory factor 5)
IRF7	regulační faktor interferonu 7 (interferon regulatory factor 7)
IRF8	regulační faktor interferonu 8 (interferon regulatory factor 8)
ISRE	interferony stimulující prvek odpovědi (IFN-stimulated response element)
I $\kappa$ Bs	Inhibitor $\kappa$ B

JNK	c-Jun N-terminální kináza (c-Jun <u>N</u> -terminal <u>k</u> inase)
LPB	protein vážící lipidy (lipid <u>b</u> inding protein)
LPS	lipopolysacharid
LRR	na leucin bohaté opakování (leucin <u>r</u> ich <u>r</u> epeat)
LRR	opakující se sekvence bohatá na leucin (leucin <u>r</u> ich <u>r</u> epeat)
LUBAC	komplex, který vytváří lineární řetězce ubikvitinu (linear <u>u</u> biquitin <u>a</u> ssembly <u>c</u> omplex)
MAL	adaptorový protein jako MyD88 (MyD88 <u>a</u> daptor- <u>l</u> ike)
MAP p38	mitogenem aktivovaná proteinkináza p38 (mitogen- <u>a</u> ctivated proteinkinase p38)
MAP2K	mitogenem aktivovaná proteinkináza kináz (mitogen- <u>a</u> ctivated proteinkinase <u>k</u> inase)
MAP3K	mitogenem aktivovaná proteinkináza kináz kináz (mitogen- <u>a</u> ctivated proteinkinase <u>k</u> inase <u>k</u> inase)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen- <u>a</u> ctivated proteinkinase)
miRNA	microRNA
MKK	mitogenem aktivovaná proteinkináza kináz (mitogen- <u>a</u> ctivated proteinkinase <u>k</u> inase)
MKKK	mitogenem aktivovaná proteinkináza kináz kináz (mitogen- <u>a</u> ctivated proteinkinase <u>k</u> inase <u>k</u> inase)
MMP-8	matrixová metaloproteináza 8 (matrix <u>m</u> etallopeptidase 8)
MMP-9	matrixová metaloproteináza 9 (matrix <u>m</u> etallopeptidase 9)
MyD88	protein primární diferenační myeloidní odpovědi (myeloid <u>d</u> ifferentiation primary response protein 88)
NAK	s NUMB asociovaná kináza (NUMB <u>a</u> ssoiated <u>k</u> inase)
NAP1	NAK asociovaný protein 1 (NAK-associated protein 1)
NES	jaderná exportní sekvence (nuclear <u>e</u> xit <u>s</u> ignal)
NIK	kináza indukující NF-κB (NF-κB <u>i</u> nducing <u>k</u> inase)
NLS	jaderná lokalizační sekvence (nuclear <u>l</u> ocalisation <u>s</u> eqeunce)
NRS	reaktivní formy dusíku (nitrogen <u>r</u> eactive <u>s</u> pecies)
NTD	N-terminální doména (N- <u>t</u> erminal <u>d</u> omain)
Nurr1	s jádrem spojený receptor 1 (nuclear receptor related-1 protein)
PAMPs	molekulární struktura asociovaná s patohgeny (pathogen <u>a</u> ssoiated <u>m</u> olecular <u>p</u> atens)
Peli1	homolog proteinu pellino 1 (protein <u>p</u> ellino homolog <u>1</u> )
PI3K	kináza fosfatidylinositolu 3 (phosphoinositide <u>3</u> - <u>k</u> inases)
PKB	proteinkináza B
PPRs	receptory rozpoznávající patogenní vzory (patern- <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptors)
ProST	proline/serine/threonine-bohatá doména
RANK	receptor aktivující NF-κB (receptor <u>a</u> ctivator of NF-κB)
RAUL	RTA asociovaná ubikvitin ligáza (RTA- <u>a</u> ssoiated <u>u</u> biquitin <u>l</u> igase)
RHIM	motif homotypicky interagující s receptorem pro protein kinázu 1 (receptor-interacting protein kinase 1 <u>h</u> omotypic <u>i</u> nteraction <u>m</u> otif)
RIP1, RIP1K	s receptorem interagující protein 1 (receptor <u>i</u> nteracting protein 1)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
SARM	protein obsahující motivy α aseptický a armadillo (sterile α and <u>a</u> rmadillo motif containing protein)
ssRNA	jednošroubovice RNA
T	thymin
TAG	adaptor TRAMu s GOLD doménou (TRAM <u>a</u> daptor with <u>G</u> OLD domain)
TAK1	kináza transformujícího růstového faktoru β (transforming growth factor β <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase 1)
TANK	s rodinou TRAF asociovaný NF-κB aktivátor
TBK1	TANK vážící kináza 1 (TANK-binding kinase 1)
TGF-β	transformující růstový faktor (transforming growth <u>f</u> actor β)
TIR	(Toll/interleukin-1 receptor),
TLR	receptor podobný proteinům rodiny toll (Toll <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor)
TM	transmembránový
TNF-α	tumor nekrotický faktor α (cytokine like tumor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor α)

TOLLIP	protein interagující s proteiny toll ( <u>T</u> oll <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein)
TPA	tkáňově specifický aktivátor plasminogenu ( <u>t</u> issue <u>p</u> lasminogen <u>a</u> ktivator)
TRAM	adaptorový protein příbuzný TRIF ( <u>T</u> RIF- <u>r</u> elated <u>a</u> daptor <u>m</u> olecule)
TRE	prvek odpovědi na tetracyklin ( <u>t</u> etracycline <u>r</u> esponse <u>e</u> lement)
TRIF	interferon $\beta$ indukující adaptér s TIR doménou ( <u>T</u> IR- <u>d</u> omain- <u>c</u> ontaining adapter- <u>i</u> nducing interferon- $\beta$ )
$\beta$ -TrCP1	protein s opakováním $\beta$ -transducinu ( $\beta$ - <u>t</u> ransducin <u>r</u> ep $\beta$ <u>c</u> ontaining protein)

## 1. Úvod

Zánětlivé a degenerativní procesy v centrální nervové soustavě představují významné ohrožení celého organismu. Rezidentní makrofágy centrální nervové soustavy, gliové buňky nazývané mikroglie, hrají v těchto procesech zásadní úlohu. Jsou jedinými imunokompetentními buňkami přítomnými za fyziologického stavu v CNS. Navíc se také účastní vývoje, údržby a regenerace CNS. Jsou typické buď prozánětlivým anebo protizánětlivým působením, a to v závislosti na přijímaných signálech a mikroprostředí, v němž jsou přítomny. Toto nastavení mikrogliaální populace má poté dalekosáhlé důsledky v celé CNS. V rámci studia signalizace v mikroglíích se několik posledních let dostávají do popředí zájmu receptory TLR. Ty patří do skupiny PPRs, detekují PAMPs a DAMPs specificky pro každý ze 12 subtypů receptoru u myši (TLR 1-9, TLR 11-13) a z 10 subtypů u člověka (TLR 1-10). A pokrývají tak antigenní detekci částic od virů, přes houby až po prvoky. Signalizace TLR využívá hlavně dvě signalizační dráhy, MyD88-dependentní dráhu a TRIF-dependentní dráhu. Ty amplifikují signály přes signalozomy složené z proteinů rodin IRAK a TRAF, a přes spojené kinázy aktivují transkripční faktory například NF- $\kappa$ B a AP-1 a také síť kináz MAP. Aktivace těchto proteinů s prozánětlivým působením, pak vede k produkci prozánětlivých cytokinů, například IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ . Ty působí na další přítomné buňky a způsobují přechod celé populace do prozánětlivého fenotypu, který následně ústí buď ve vyřešení nastalé situace anebo v její přechod do chronického patologického stavu. Dále se také aktivují transkripční faktory z rodiny IRF, které aktivují imunitní odpověď proti virům. Cílem práce je nastínit dosavadní poznatky o funkci a průběhu TLR-dependentní signalizace v mikroglíích, jejíž další výzkum se jeví být klíčovým pro úspěšný postup v řešení celé řady patologií CNS, jako jsou záněty, hypoxie anebo neuropsychiatrická onemocnění.

## 2. Mikroglie

Rezidentními makrofágy centrální nervové soustavy jsou gliové buňky nazývané mikroglie. Koncept existence gliových buněk v rámci nervové tkáně pochází již z konce 19. století, ovšem byl to teprve Španěl Santiago Ramón y Cajal, kdo odlišil různé typy gliových buněk od sebe. Jím navrženou teorii tří buněčných typů posléze rozšířil v sérii průlomových článků Pio del Río Hortega definováním mikroglíí, oligodendrocytů a astrocytů <sup>1</sup>. Mikroglie zodpovídají za celou paletu funkcí v rámci ontogeneze a údržby nervové soustavy. Účastní se například fagocytózy apoptotických buněk a buněčného odpadu <sup>2</sup>, poskytování podpurných růstových faktorů neuronům v průběhu vývoje <sup>3</sup>, procesu obměny myelinu <sup>4</sup>, organizace synaptických spojení <sup>5</sup> a kontroly neuronální excitability <sup>6</sup>.

Procentuální zastoupení mikroglíí v rámci nervové tkáně je odvislé od anatomické oblasti, kterou popisujeme. U myši je to mezi 5 % a 12 % celkové buněčné populace <sup>4</sup>, u člověka se pak zastoupení pohybuje mezi 0,5 % a 16,6 % procenty celkové buněčné populace. Obecně lze konstatovat, že v bílé hmotě je koncentrace větší než v hmotě šedé a že lze nejvíce mikroglíí nalézt v prodloužené míše a nejméně v šedé kůře mozečku <sup>7</sup>. Ve fyziologických podmínkách vykazuje lokální koncentrace mikroglíí v tkáních silnou závislost jak na daném mikroprostředí, tak na signálech, které přítomné buňky

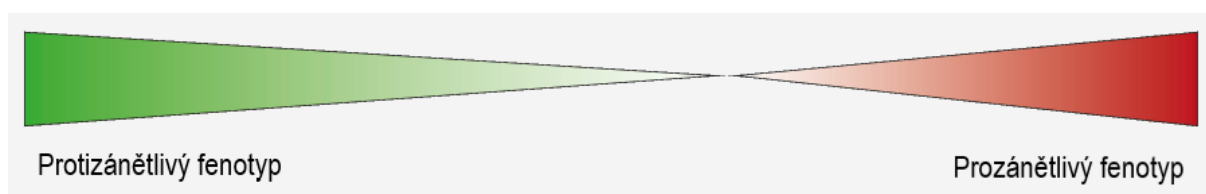


získávají z okolí. Pokud dojde k vychýlení fyziologického stavu, jsou mikroglie schopné velmi flexibilní změny morfologie a exprese povrchových antigenů, rapidní proliferace, výrazné fagocytické aktivity a exocytózy prozánětlivých faktorů jako jsou chemokiny a cytokiny, spolu s reaktivními formami kyslíku a dusíku - ROS a NRS<sup>8-10</sup>. Fenotyp mikroglíí v rámci onemocnění je odvislý od komplexní interakce mezi patologií, přítomnými populacemi neuronů, astrocytů, oligodendrocytů a samotných mikroglíí a také na mikroprostředí, v jehož rámci interakce probíhá. Závisí tedy jak na konkrétní patologii, tak na její lokalizaci v rámci centrální nervové soustavy<sup>11</sup>.

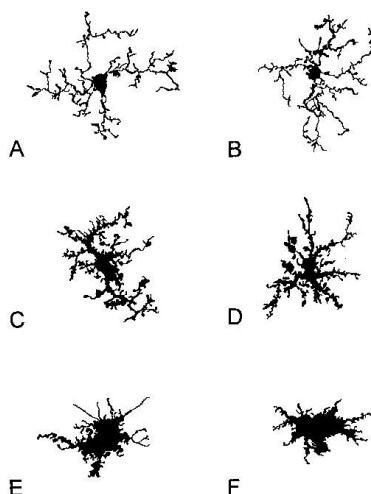
Teorii mezoderálního (myeloidního) původu mikroglíí představil už jejich objevitel Pio del Río Hortega<sup>1</sup>. I přestože byl později postulován jejich původ jako ektodermální, byla tato teorie jednoznačně potvrzena recentní studií mapující buněčné osudy<sup>12</sup>. Ačkoli není znám přesný transkripční program determinující mikroglionogenezi, bylo zjištěno, že prekuzory mikroglíí v rané embryogenezi jsou CD45<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> erytromyeloidní kmenové buňky. Subpopulace těchto buněk projde okolo E 8.0 pod vlivem IRF8 a AML1 signalizace transformací z CD45<sup>-</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> na CD45<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> c-kit<sup>-</sup> a započne kolonizaci nervové tkáně za pomoci MMP-9 a MMP-8, a to krátce po vytvoření primitivního oběhového systému<sup>12-14</sup>. Po vstupu do neurální trubice začnou progenitory CD45<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> tlumit expresi pro makrofágy typického proteinu F4/80 a vykazovat typickou mikroglíální morfologii a fagocytickou aktivitu apoptotických neuronů<sup>13</sup>. Populace takto vzniklých mikroglíí je v průběhu života udržována výhradně dělením, příspěvek infiltrujících makrofágů k ní je prakticky zanedbatelný<sup>15,16</sup>. Je tak jedinou populací myeloidních buněk ve zdravém mozku. Ostatní myeloidní buňky, například makrofágy vzniklé dělením kmenových buněk z kostní dřeně, mohou infiltrovat nervovou tkáň v případě akutního zánětu, či v případě zničení rezidentní populace<sup>17,18</sup>. Za normálního stavu jsou přítomny v okolí nervové tkáně, tj. v mozkových obalech a choroidním plexu<sup>19</sup>.

Mikroglíální populace v mozku jsou stratifikovány jak funkčně, tak morfologicky. Popis této stratifikace doznal během posledního desetiletí velmi rapidního vývoje, stejně jako popis obecné klasifikace makrofágů. Původní terminologie založená na stavu aktivace představená Millsem předpokládala existenci dvou jasně odlišitelných stavů, a to klasického – M1 a alternativního – M2<sup>20</sup>. Oba tyto stavy jsou definovány expresí různých metabolických programů, pro první z nich je typická prozánětlivá aktivita, produkce, ROS, NRS IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 a TNF- $\alpha$ <sup>21,22</sup>. Je současně spojený s aktivací pomocí LPS, či IFN- $\gamma$ . Naproti tomu stojí typ aktivace alternativní, který vykazuje aktivitu protizánětlivou, produkuje trofické faktory jako TGF- $\beta$ , BDNF, GDNF a protizánětlivé cytokiny IL-1 a IL-4<sup>23,24</sup>. Zároveň je právě těmito cytokiny modulován<sup>25</sup>. Vzhledem k neustále narůstajícímu se množství poznatků, a to zvláště v in vivo situacích, dnes již tato klasifikace nedostačuje. Ukazuje se, že fenotyp aktivace makrofágů může být smíšený. Snaha o představení modelu, který by lépe vystihl skutečnou situaci stále probíhá. V minulosti se objevil např. model rozšiřující počet stavů na 3, a to regulační, aktivovaný a poškození regenerující<sup>26</sup>. Ani tento model ovšem není ideální, podle rozsáhlé studie transkriptomu situaci zřejmě nejlépe vystihuje model popisující aktivaci jako spektrum,

tj. komplexní soubor mezistavů vedoucích od jednoho extrému k druhému. Na finální podobě tohoto modelu však dosud není konsensus<sup>27–29</sup>. Dle Murraye a kol. by měla být klasifikace makrofágů in vitro prováděna na základě většího počtu faktorů, a to konkrétního organismu, způsobu izolace buněčné populace, doby a podmínek pěstování v kultuře, původu a koncentrace diferenciačních cytokinů, výtěžku makrofágů/velikosti původní populace, aktivačních podmínek a způsobu zpracování a následné analýzy. Pro analýzu makrofágů in vivo, by měl být používán minimálně systém založený na aktivačních standardech, které představují jednotlivé extrémy mezistavů, a které jsou v článku dále specifikovány<sup>30</sup>. „Prozánětlivý“ a „protizánětlivý“ fenotyp si pak lze představit jako pohyb po ose aktivace (obr. 1).



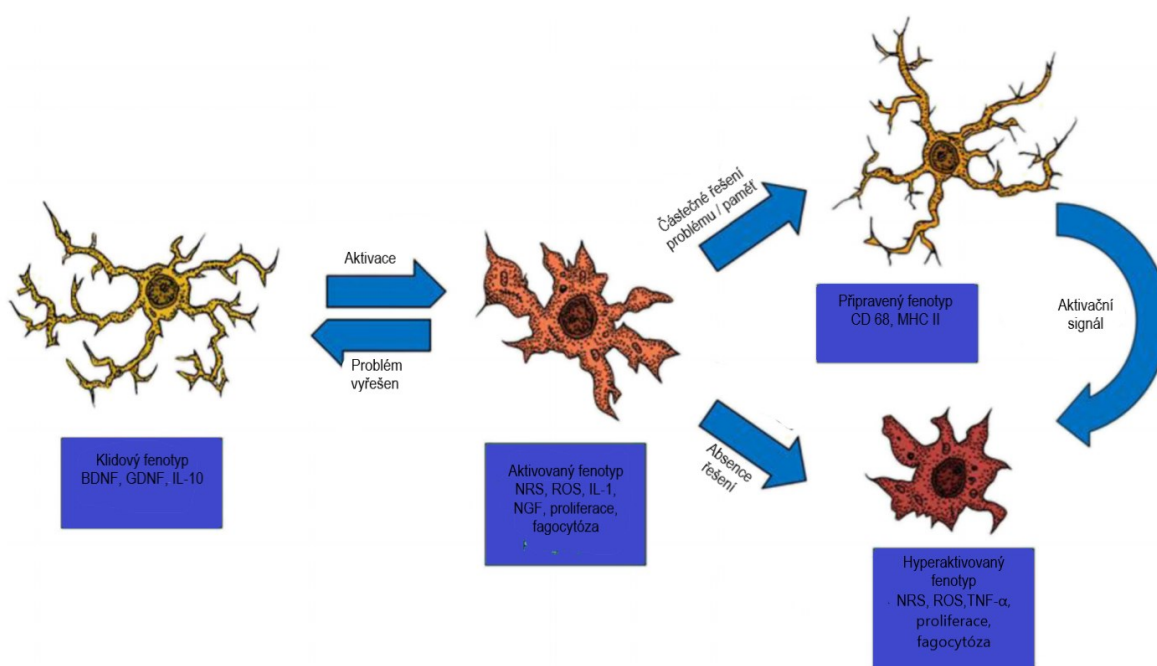
Obr. 1: Spektrum aktivačních stavů makrofágů. Převzato a upraveno<sup>30</sup>.



Obr. 2: Morfologie mikroglíí<sup>31</sup>. A, B jsou mikroglie rozvětvené, C, D mikroglie hypertrofované, E, F mikroglie chundelaté. Améboidní mikroglie nejsou pro zjednodušení zobrazeny.

Se stavem aktivace mikroglíí souvisí také fenotyp jejich morfologie, a to nepřímě. Můžeme rozlišit tři až čtyři základní typy morfologií<sup>32</sup>. Základním a zároveň klidovým stavem je stav takzvané rozvětvené mikroglie. Mikroglie v tomto stavu neustále skenují své okolí rozsáhlými výběžky cytoplazmatické membrány ve snaze lokalizovat možné poškození, zatímco jejich těla zůstávají téměř stacionární, jsou kulovitá s velkým jádrem a malým množstvím perinukleární cytoplazmy. Rozvětvené mikroglie zodpovídají hlavně za údržbu nervové tkáně. Poskytují neuronům neurotrofní faktory<sup>3</sup>, mají neuroprotektivní účinek<sup>33</sup> a odpovídají na stres<sup>34</sup>. Za fyziologických podmínek je v tomto morfotypu

většina mikrogliaální populace<sup>35</sup>. Dalším morfotypem jsou mikroglie améboidní. Tento stav je typický hlavně pro vyvíjející se nervovou soustavu<sup>36</sup> a zánět<sup>37</sup>, je to stav morfologicky nejpodobnější klasickým makrofágům.<sup>38</sup> Třetím typem je morfotyp mikroglie intermediální, který je ještě dále možno rozdělit na mikroglie hypertrofované a mikroglie chundelaté. Přičemž jak mikroglie hypertrofované, tak mikroglie chundelaté mají podobný tvar jako mikroglie rozvětvené, ale větší těla a silnější výběžky. Mikroglie chundelaté mají navíc výrazně redukovanou složitost rozvětvení a o to rozsáhlejší těla, viz obrázek 2<sup>31</sup>. Do tohoto dělení není tradičně řazen poslední typ, a to je pěnový makrofág. Ty vznikají, pokud mikroglie pohltí pomocí svých scavenger receptorů (například TLR<sup>39</sup>) velké množství lipoproteinů, které v nich zagregují. Tento fenotyp je typický pro roztroušenou sklerózu, kde mikroglie internalizují myelin<sup>40,41</sup>.



Obr. 3: Fenotypy mikroglíí a jejich charakterizace dle K. Kosse. Převzato a upraveno<sup>42</sup>.

Zároveň byl také navržen systém, který částečně překrývá jak fenotyp aktivace, tak morfotyp<sup>42</sup>. Ten rozlišuje 4 fenotypy mikroglíí, a to mikroglie klidové, aktivované, připravené a hyperaktivované (obr. 3). Dle tohoto systému je za fyziologických podmínek majorita mikroglíí ve stavu klidovém, tyto mikroglie vykazují rozvětvený morfotyp, produkci protizánětlivého IL-10, BDNF, GDNF. Po přijetí signálu o zánětu, nebo poškození, (například LPS, INF- $\gamma$ ) přecházejí klidové mikroglie do stavu aktivovaného, s morfotypem améboidním, až hypertrofovaným. Aktivované mikroglie rapidně proliferují, vykazují fagocytické schopnosti, sekreci prozánětlivých cytokinů, ROS a NRS. Pokud nedojde k aktivaci mikroglíí k vyřešení problému, mohou mikroglie přejít do fenotypu hyperaktivovaného. Ten vyazuje výraznější prozánětlivou aktivitu a chundelatý morfotyp. Hyperaktivované mikroglie navíc rekrutují astrocyty, ty v jejich přítomnosti hypertrofují, navyšují

produkcí GFAP a při fyzickém poškození CNS tvoří gliové jizvy<sup>43</sup>. Tento fenotyp je spojen s celou řadou patologií CNS<sup>44,45</sup>. Mimo ně můžeme ještě rozlišit fenotyp připravený, ten je od klidového odlišitelný sníženou produkcí neurotrofních faktorů a odlišným složením membránovým proteinů – hlavně zvýšenou produkcí CD68 a MHC II<sup>45</sup>. Tento má pravděpodobně paměťovou funkci a po aktivaci může přecházet ve fenotyp hyperaktivovaný<sup>42</sup>.

### 3. Signální systémy TLR receptorů

Signalizace TLR receptorů využívá dvě signalizační dráhy, a to MyD88 dependentní dráhu a TRIF dependentní dráhu. Signál je veden přes efektorové kinázy, MAP kinázy a IKK kinázy<sup>46,47</sup>. S výjimkou TLR3, který využívá pouze adaptér TRIF, amplifikují všechny TLR receptory MyD88 závislou aktivaci MAP a IKK kináz přes dráhy zahrnující IRAK kinázy<sup>48</sup> a adaptéry TRAF, přes které je vedena i alternativní TRIF dependentní dráha<sup>49,50</sup>. I přes zdánlivě poměrně homogenní podobu signalizace je u ní vyvolaná genová exprese specifická, a to díky zapojení dalších adaptorových proteinů.

#### 3.1. Asociované signální molekuly

##### MyD88

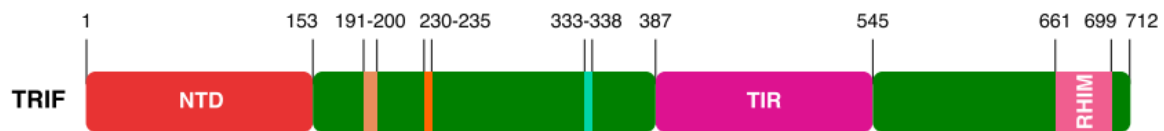


Obr. 4: Struktura proteinu MyD88. Vyznačeny jsou DD doména a v rámci ní místo pro vazbu proteinů IRAK (27-72), ID doména a TR doména. Převzato a upraveno<sup>58</sup>

Gen *MyD88* byl poprvé popsán roku 1990 jako jeden z genů se zvýšenou expresí při IL-6 dependentní myeloidní diferenciaci<sup>51</sup>. Tento cytosolický adaptorový protein je homologní cytosolickým doménám proteinů Toll u *Drosophily* a IL-1R u savců. MyD88 účastní signalizace TLR receptorů a receptorů IL-18R a IL-1R<sup>46,52</sup>. Jak je patrné z obrázku 4, tento protein se skládá ze tří dobře vymezených domén, N – koncové DD domény, C-koncové TIR domény, a kratší ID domény. DD doména je schopná homotypické interakce s IRAK proteiny, která nakonec vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a AP-1<sup>53</sup>. TIR doména zodpovídá za homotypické (v některých případech i heterotypické) interakce s TIR doménou obsahujícími proteiny, jako jsou TLR<sup>54</sup>. Intermediární doména slouží jako spojka obou výše zmíněných, a je zásadní pro skládání proteinu, přesněji jeho DD domény (pravděpodobně vhodnou prostorovou orientací domén v prostoru<sup>55</sup>. Její delecí při sestřihu vzniká forma neschopná rekrutovat IRAK4 do signalizačního komplexu, a tím dochází k inhibici dráhy vedoucí k NF- $\kappa$ B, přičemž zůstává zachována aktivace MAP. Tento typ sestřihu je indukován v rámci aktivace buňky přes TLR a působí tak jako negativní regulace<sup>56,57</sup>.

## TRIF

TRIF je adaptorovým proteinem receptorů TLR3 a TLR4. Na obrázku č. 5 můžeme vidět, že funkčně je TRIF složen z NTD domény, TIR domény, a RHIM domény, mimo nich obsahuje ještě sekvence pro interakce s proteiny TRAF a TBK1. V savčím organismu je obecně exprimován konstitutivně v nízké koncentraci, a difúzně rozptýlen v cytoplasmě<sup>59</sup>. Autoinhibice TRIF v klidovém stavu je zajištěna interakcí TIR domény s NTD doménou<sup>60</sup>.



Obr. 5: Struktura proteinu TRIF. Vyznačeny jsou zleva NTD doména, místa pro interakci s TBK1 (191-200), s TRAF6 (230-235) a s TRAF2 (333-338), TIR doména a doména RHIM. Převzato a upraveno<sup>58</sup>.

## IRAK

Byly identifikovány 4 savčí proteiny patřící do rodiny kináz IRAK a to IRAK-1<sup>61</sup>, IRAK-2<sup>52</sup>, IRAK-M<sup>62</sup> a IRAK-4<sup>63</sup>, všechny se účastní MyD88 dependentní signalizace. Obecně se proteiny rodiny IRAK skládají ze tří domén, N – terminální DD domény, zajišťující interakci s MyD88 a/nebo dimerizaci, ProST domény a serin/threonin kinázové domény (pseudokinázové u proteinů IRAK-2 a IRAK-M<sup>64-66</sup>). Na konci C-konci všech proteinů mimo IRAK4, pak najdeme zásadní TRAF6 vazebnou doménu<sup>67</sup>.

## TRAF

Rodina s TNF asociovaných faktorů se u savců skládá ze 7 proteinů, TRAF1-7<sup>68-73</sup>. Proteiny této rodiny jsou důležitými signálními molekulami, účastní se například signalizace receptorů TNF-R, RLR, IL-1R a TLR<sup>49,69,74,75</sup>. Jsou proto zásadní pro modulaci zánětu a apoptózy. Kromě proteinu TRAF1 mají na N-konci RING doménu, typickou pro E3 ubikvitin ligázy, následovanou sekvencí několika opakování domény zinkového prstu, a doménou TRAF, ta zodpovídá za vazbu molekul k receptorům a za interakce s molekulami postavenými níž v rámci signální kaskády<sup>76-78</sup>.

## Sít' kináz MAP

Sít' kináz MAP je komplexní regulační systém, který se skládá minimálně ze 3 pater na sobě závislých kináz. Fosforylace jednotlivých pater kaskády umožňuje amplifikaci a integraci signálů přicházejících výše ze signální dráhy. Nejvyšším patrem jsou MAP3K, které fosforylují MAP2K, na nichž jsou závislé kinázy MAPK.

Hlavní MAP3K TLR signalizace je TAK1, kináza trvale přítomná v trimerním komplexu buď s proteiny TAB1-TAB2<sup>79,80</sup> anebo TAB1-TAB3<sup>81</sup>. Ty zajišťují vazbu komplexu na k-63 polyubikvitinové řetězce a fyzické přiblížení TAK1 a výše postavených členů kaskády<sup>82</sup> a pravděpodobně také účastní aktivace MAP p38<sup>83</sup>. Pod kontrolou TAK1 se nacházejí kinázy MKK4/MKK7, které aktivují JNK1/JNK2<sup>84</sup>, IKK $\beta$ <sup>85</sup>, a nepřímo kinázy MKK3/MKK6 aktivující MAP p38<sup>86,87</sup> a MKK1/MKK2 kontrolující ERK1/ERK2<sup>88</sup>. Ty jsou podřazeny MAP3K TPL2, která je inaktivována komplexní vazbou na p105 a aktivována jeho k-48 ubikvitinací a odbouráním, které indukuje TAK1<sup>89,90</sup>. Byly naznačeny pochybnosti o významu TAK1 v TLR dependentní signalizaci, zakládají se na pozorováních provedených v *TAK1*<sup>-/-</sup> neutrofilech a makrofázích. V prvních způsobuje delece navýšenou expresi prozánětlivých faktorů a v druhých zůstává produkce zachována, ale výrazně se zvyšuje pravděpodobnost apoptózy<sup>91</sup>. Lze ovšem konstatovat, že za zvýšenou apoptickou aktivitou stojí pravděpodobně antiapoptické účinky TAK1<sup>92</sup>. A za zvýšenou/zachovanou produkcí faktorů pak pravděpodobně stojí nahrazení kinázy TAK1 kinázou MEKK3, která je za fyziologických podmínek pod negativní regulací TAK1<sup>93</sup>. Další asociovanou MAP3K je ASK1, ta se aktivuje nepřímo na základě své inhibiční vazby na thioredoxin<sup>94</sup>. Ten je vyvázan po interakci s ROS indukovanými právě TLR, vyvázaný ASK1 tvoří signalosom a aktivuje MKK3/MKK6, a tedy MAP p38<sup>95,96</sup>. A poslední je výše zmiňována MEKK3, jejíž role v signalizaci není objasněna<sup>93,97</sup>.

U savců existují tři obecné typy kináz MAPK, ERK, MAP p38 a JNK. Rodina kináz MAP p38 má v savčím organismu 4 distinktivní členy p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\delta$ , p38 $\gamma$ , ty se liší jak substrátovou, tak aktivační specifitou. V populacích makrofágů je nejvíce zastoupena p38 $\alpha$ <sup>98</sup>. Z rodiny kináz ERK jsou v savčím organismu nejzásadnější ERK1/ERK2<sup>99</sup> a z rodiny kináz JNK potom JNK1/JNK2<sup>100</sup>. Pod kontrolu kináz MAP spadá řada zásadních buněčných procesů, například aktivace transkripčních faktorů<sup>101</sup>, indukce přestavby chromatinu<sup>102</sup>, regulace stability<sup>103</sup> a lokalizace proteinů<sup>104</sup>, stability mRNA<sup>105</sup>, dynamiky cytoskeletu<sup>106</sup> a nebo endocytóza<sup>104</sup> či apoptóza<sup>107</sup>.

## 3.2. Asociované transkripční faktory

### NF- $\kappa$ B

Signalizace založená na rodině jaderných faktorů  $\kappa$ B je zásadní pro regulaci buněčné genové exprese, a to hlavně v případě zánětu<sup>108</sup>. Proteiny NF- $\kappa$ B představují archetyp faktoru rychlé odpovědi, konstitutivně přítomného v cytoplazmě v neaktivní formě, a to buď prostým nesestřizněním anebo interakcí s rodinou proteinů I $\kappa$ B<sup>109,110</sup>. Jsou konzervovány od *Drosophila* až k člověku<sup>111</sup>. Do dnešního dne bylo charakterizováno 5 jejích členů, p50 (prekurzor p105), p52 (prekurzor p100), RelA (p65), RelB a c-Rel. Ty tvoří hetero- i homo-dimery, a vytváří tak pravděpodobně 13 různých NF- $\kappa$ B komplexů, většinou aktivátorů transkripce, ovšem i zde se vyskytují výjimky, například homodimer p50/p50<sup>112</sup>. Stovky genů pod kontrolou NF- $\kappa$ B obsahují charakteristický téměř palindromický konsensus sekvence a to 5'-GGGRNYYYCC-3' (R představuje purin, Y pyrimidin, a N jakýkoli nukleotid). Tuto konsensus sekvenci nazýváme  $\kappa$ B<sup>108,113</sup>.

NF- $\kappa$ B signalizace je aktivována dvěma hlavními drahami, označovanými tradičně jako klasická a alternativní. Obě jsou závislé na asociovaném holokomplexu, IKK kináze, ten se skládá ze tří proteinů, kináz IKK $\alpha$  a IKK $\beta$  a regulační podjednotky NEMO, jinak také IKK. Ta slouží jako scaffold a zajišťuje interakci s výše postavenými členy kaskády přes M1-vázané ubikvitinové řetězce<sup>47,114</sup>. Sám NEMO může být navíc K-63 ubikvitinován, což vede k další regulaci asociované signalizace<sup>115</sup>.

Alternativní cesta aktivovaná například po interakci receptorů LT $\beta$ R<sup>116</sup>, BAFFR<sup>117</sup>, RANK<sup>118</sup> nebo CD40<sup>119</sup>, závisí výhradně na činnosti IKK $\alpha$ <sup>120</sup>. Zásadním hráčem alternativní signalizace je protein NIK, ten se ve fyziologických podmínkách vyskytuje ve velmi nízké koncentraci, a to díky neustálé degradaci indukované jeho interakcí s proteinem TRAF3, ústící v ubikvitinaci a proteozomální degradaci. Po aktivaci spřaženého receptoru tento verbuje TRAF3 a zajišťuje jeho vlastní ubikvitinaci a degradaci, což následně zajistí postupnou kumulaci NIK<sup>121</sup>. Tuto interpretaci silně podporuje fakt zastavení signalizace po ablaci proteosyntézy<sup>122</sup>. Přímým důsledkem tohoto nepřímého způsobu aktivace je velmi pomalá kinetika signalizace, řádově pomalejší než je kinetika u aktivace klasické<sup>123</sup>. S postupně narůstající koncentrací NIK dochází k aktivaci IKK $\alpha$ , která za použití NIK jako dokovací platformy, fosforyluje několik kritických míst prekursoru p52, p100. To vede k rozeznání p100 ubikvitinačním komplexem, ubikvitinaci a 26S proteazomální degradaci inaktivující části, bez níž může protein translokovat do jádra a modulovat transkripci<sup>110,124</sup>.

Klasická cesta aktivace, typická pro signalizaci PPR<sup>125</sup>, TNFR<sup>126</sup>, TCR<sup>127</sup> a BCR<sup>128</sup>, vyžaduje ke svému správnému průběhu celý enzymatický holokomplex<sup>129,130</sup>. Signalizace začíná aktivací IKK $\beta$  fosforylací kinázou TAK1, IKK $\beta$  ve své aktivní formě fosforyluje I $\kappa$ B navázaný na NF- $\kappa$ B komplex<sup>85,131</sup>. Fosforylovaný I $\kappa$ B je analogicky k alternativní cestě rozeznám ubikvitinačním komplexem, k-48 ubikvitinován a rozložen 26S proteazomem<sup>132</sup> (obr. 7). To vede k odhalení jaderného lokalizačního signálu na NF- $\kappa$ B a jeho translokaci do jádra, kde může modulovat transkripci. Mimo toho aktivovaná IKK $\beta$  s největší pravděpodobností zodpovídá i za p100 analogické zpracování proteinu p105 a tím za kontrolu jím inhibovaného TPL2, který navíc aktivuje fosforylací<sup>88,90</sup>, a fosforyluje transkripční faktor IRF5<sup>133</sup>. Výsadní postavení IKK $\beta$  v klasické cestě aktivace může být částečně nahrazeno za nepřítomnosti/nefunkčnosti IKK $\beta$  i kinázou IKK $\alpha$ <sup>134,135</sup>.

## AP-1

Skupina transkripčních faktorů AP-1 patří stejně jako faktory NF- $\kappa$ B k základním regulátorům genové exprese, a to jak basální, tak indukované. Jsou charakterizované vazbou na konsenzuální sekvenci 5'-TGAG/CTCA-3', označovanou jako TRE<sup>136</sup>. Skupina AP-1 je složená primárně z proteinů rodin Jun a Fos<sup>137,138</sup>, a mimo nich ještě z proteinů podrodin ATF a JDP<sup>139,140</sup>. Strukturně je pro tyto proteiny typická konzervovaná bZIP doména, tj. leucinový zip v kombinaci se základní DNA-vazebnou doménou. Aktivované faktory dimerizují prostřednictvím leucinových zipů, což indukuje DNA-vazebnou aktivitu dimeru.<sup>141</sup> Transaktivační potenciál jednotlivých dimerů leží ve velkém rozmezí, od

silných aktivátorů, až k represorům, čímž je dosaženo vysoké heterogenity signalizace <sup>142,143</sup>. Té odpovídá i velmi komplexní systém regulace faktorů AP-1, z nějž je nejdůležitější fosforylace faktorů AP-1 výše postavenými kinázami, například ERK, nebo JNK <sup>144</sup>.

## IRF

Rodina transkripčních faktorů IRF, poprvé popsána roku 1988 na základě pozorování cDNA genu pro IRF1, je zásadním hráčem v rámci antivirové imunitní signalizace <sup>145</sup>. Zajišťují například kontrolu produkce Interferonů I. třídy, na které se podílí i NF- $\kappa$ B a AP1 <sup>146,147</sup>. Je pro ně typická vysoce konzervovaná N-terminální DNA-vazebná doména, IAD doména a neredundantní C-terminální doména, kde dvě poslední společně zajišťují funkční heterogenitu <sup>148</sup>. DNA-vazebná doména rozeznává typickou konsenzuální sekvenci nazývanou ISRE, neboli 5'-AANNGAAA-3' <sup>149</sup>. IAD doména slouží k mediaci dimerizace nutné ke správné funkci DNA-vazebné domény, a C-terminální doména zajišťuje regulaci funkce faktorů přes svá fosforylační místa <sup>148,150</sup>. V rámci proteinu jsou navíc přítomny lokalizační signály NES a NLS <sup>145,151</sup>. TLR dependentní signalizace ústí majoritně v aktivaci faktorů 3, 5 a 7 <sup>152,153</sup>.

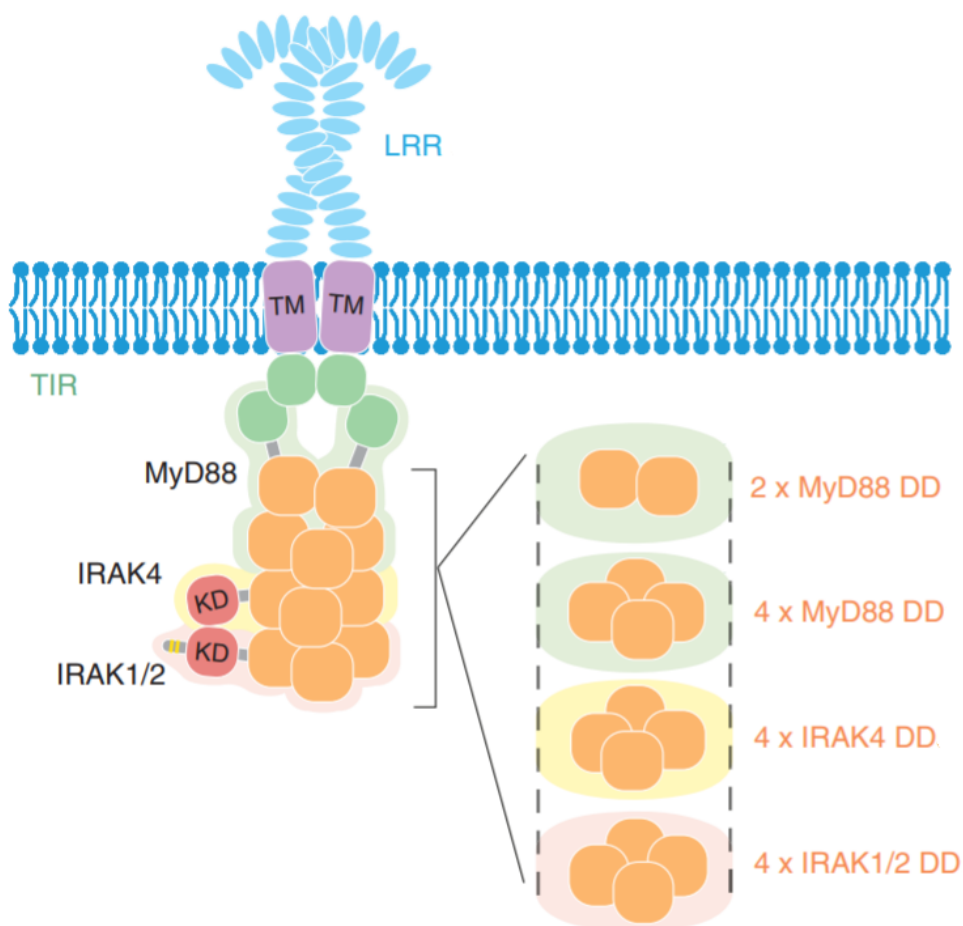
Při hledání homologů primární sekvence IRF1 byl charakterizován konstitutivně exprimovaný faktor s vazebnou specifitou pro ISRE, IRF3 <sup>154</sup>. Ten je v klidovém stavu díky přítomnosti jak NES, tak NLS sekvence neustále exportován mezi jádrem a cytoplasmou, a díky převaze NES signálu koncentrován v cytoplasmě <sup>151</sup>. Zároveň je v tomto stavu autoinhibován a neschopen dimerizovat, pravděpodobně skrytím klíčových zbytků v hydrofobním jádře <sup>155,156</sup>. K aktivaci signalizace je tak nutné převést IRF3 do aktivní konformace a zároveň jej zkoncentrovat v karyoplasmě. Toho je dosaženo několikanásobnou fosforylací na serin bohaté regulační oblasti lokalizované na C-konci proteinu, která zajišťuje přes drobnou konformační změnu odkrytí klíčových zbytků <sup>150</sup>. Aktivní forma proteinu je pak transportována do jádra, kde dimerizuje, interaguje s kofaktory CBP/p300, tím se lokalizuje v karyoplasmě <sup>157</sup>, a konečně vykazuje specifickou DNA-vazebnou aktivitu <sup>146</sup>. Kinetika aktivace IRF3 je díky konstitutivní přítomnosti faktoru v cytoplasmě brzká, a právě zde nalézáme hlavní funkční rozdíl mezi ním a faktorem IRF7. Jeho exprese je indukovaná a klidová koncentrace prakticky nulová (střední doba života je u IRF7 řádově nižší než u IRF3). Sám tak vykazuje pozdní kinetiku a díky přímé kooperaci s IRF3, kterým může být i indukován, dává prostor pro zohlednění vícenásobné aktivace kaskády skrze pozitivní vazebnou smyčku. Díky tomu prvotní aktivace IRF3 indukuje primárně interferon  $\beta$ , a následné aktivace ústící v kooperaci IRF3/IRF7 indukují jak interferon  $\alpha$ , tak interferon  $\beta$  <sup>158</sup>. Dalším rozdílem mezi oběma faktory je možnost aktivace IRF7 v rámci komplexu složeného z TLR9 (TLR7), MyD88, proteinů IRAK, TRAF6 a IKK $\alpha$  v plasmatických dendritických buňkách, pravděpodobně pod vlivem specifické lokalizace zde přítomné signalizace <sup>159–162</sup>. Obdobným mechanismem může být aktivován i IRF5 <sup>163</sup>, který navíc podléhá aktivaci fosforylací kinázou IKK $\beta$  <sup>133</sup>. IRF5 je v makrofázích exprimován konstitutivně <sup>153</sup> a zodpovídá mimo exprese interferonů, také například za expresi prozánětlivých cytokinů, IL-6 a IL-12 <sup>153</sup>. Současná aktivace IRF5 a IRF7 vykazuje



tvorbu interferon inhibujícího heterodimeru IRF5/IRF7, který pravděpodobně zodpovídá za utlumení antivirové imunitní odpovědi <sup>164</sup>.

### 3.3. MyD88 dependentní signalizace

Po navázání ligandu na LRR ektodoménu receptoru dochází ke změně konformace jeho TIR domény, ta interaguje s TIR doménou MyD88, a započne kaskádu oligomerizace, a to jak jeho TIR, tak DD domén <sup>75</sup>. Vzniká hexamer, který následně rekrutuje 4 jednotky IRAK4, a komplex MyD88:IRAK4 je pak schopen rekrutovat 4 proteiny IRAK1 a/nebo IRAK2, a to přes interakci DD domén. Tato interakce dělí MyD88 závislou signalizaci na dvě časově oddělené fáze, časnou (0-2 h) a pozdní (2-8 h), kde časná využívá IRAK1/IRAK2 a pozdní majoritně IRAK2 (většina IRAK1 je odbourána po 2-4 h). Díky tomu dochází nejprve k velmi silné a rychlé aktivaci a následně k delší aktivaci s nižší amplitudou <sup>165</sup>. Komplex všech 4 (případně 3) proteinů nazýváme myddosom (obr. 6). Je to vrstevnatá struktura, kde jsou jednotlivé vrstvy interagujících TIR a DD domén planárně v prostoru <sup>75,166</sup>. Recentní práce Moncrieffa a jeho spolupracovníků poukazuje na možnost preformace signalozomu v cytoplazmě apriori aktivaci receptoru. Preformovaný filament MyD88 by se měl aktivovat vazbou na TIR doménu receptoru a následně rekrutovat IRAK4 <sup>55</sup>. Po zformování myddosomu je konformační změnou indukovaná autofosforylace IRAK4 <sup>167,168</sup>, autofosforylace IRAK1, a aktivace C-terminální domény IRAK1 <sup>169</sup> interagující s TRAF6 <sup>170</sup>. Následuje dimerizace RING domén TRAF6 v rámci komplexu, která ústí v aktivaci epitopů interagujících s ubikvitinačním komplexem Ubc13-Uev1A a v kaskádu k63 ubikvitinací, a to nejprve samotného TRAF6, a poté proteinů IRAK1/IRAK2 <sup>171</sup>. Vzniklé ubikvitinové řetězce, a to zřejmě ty na proteinech IRAK1 (IRAK2) <sup>172</sup>, pak slouží jako lešení pro vazbu dalších proteinů, prvořadě komplexu TAK1-TAB <sup>82</sup> a komplexu IKK. Jeho vazba navíc vyžaduje rozšíření k-63 řetězců o M1-vázané ubikvitinové řetězce komplexem LUBAC <sup>114</sup>. TAK1, navázaný na polyubikvitinové řetězce přes komplex proteinů TAB, podléhá k-63 ubikvitinaci, která indukuje autofosforylací a převedení proteinu do aktivní konformace <sup>85,173</sup>. Ke správnému průběhu TAK1 dependentní signalizace je nutné translokovat aktivovaný komplex TAK1-TRAF6 z těsné blízkosti myddosomu, a tedy membrány, do cytoplasmy <sup>170</sup>. Tomu napomáhá k-48 ubikvitin ligáza  $\beta$ -TrCP1, která váže k-48 ubikvitin na IRAK1, a podporuje tak uvolnění TAK1-TRAF6 z myddosomu <sup>174</sup>. A také autofosforylace IRAK4 indukovaná jeho vazbou na myddosom, která snižuje stabilitu komplexu <sup>168</sup>. Aktivovaný TAK1 v rámci IKK komplexu fosforyluje IKK $\beta$ , tím spouští klasickou cestu NF- $\kappa$ B aktivace (obr. 7) <sup>85,131</sup>, indukuje zpracování p105 a tedy TPL2 dependentní signalizaci <sup>90</sup> a fosforylací IRF5 <sup>133</sup>. Zároveň fosforyluje a aktivuje MKK4/MKK7, které vzápětí aktivují MAPK JNK <sup>84</sup>.

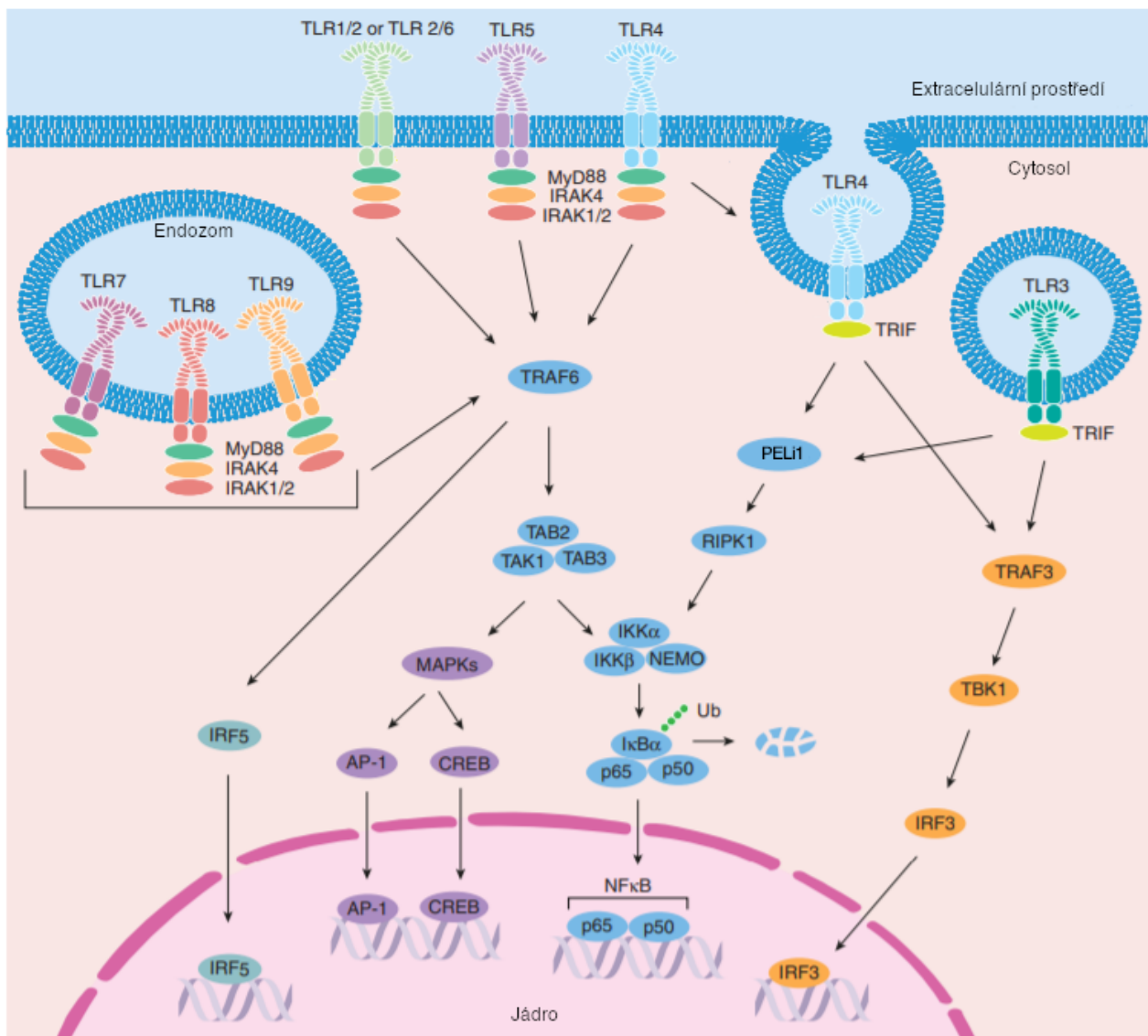


Obr. 6: Schématický model myddosomu. V horní části obrázku se nachází dimer TLR, který se skládá z LRR domén, TM domén a TIR domén. Jimi interaguje s TIR doménami dvou MyD88, na nichž se na základě nejprve TIR a DD a poté DD interakcí formuluje zbytek signalosomu. V rámci něj jsou ještě vyznačeny KD domény na proteinech IRAK. Převzato a upraveno <sup>175</sup>.

### 3.4. TRIF dependentní signalizace

Analogicky MyD88 závislé signalizaci dochází po aktivaci receptoru k TIR:TIR interakci TRIF s receptorem (či s adaptérem u TLR4, potažmo TLR2) a pravděpodobně ke konformační změně N-terminální domény TRIF, která doposud blokovala epitopy nutné k oligomerizaci a zabraňovala tak konstitutivní aktivaci <sup>60</sup>. Aktivovaný TRIF difunduje do cytoplazmy (zatímco myddosom je tvořen v těsné blízkosti receptoru), kde oligomerizuje spolu s proteiny NAP1 a RIP1 za vzniku špalkovité struktury <sup>176</sup>. Přesný průběh této oligomerizace není znám, víme ovšem, že je k jejímu správnému průběhu nutná přítomnost dalších proteinů, například 14-3-3 zeta <sup>177</sup>. Oligomerizace ústí v další změnu v epitopu N-terminální domény, která umožňuje proteinu interagovat s proteiny TRAF2/6 a TRAF3 <sup>178</sup>, ten do komplexu dále verbuje TBK1 a IKKε <sup>179</sup>. Tyto proteiny fosforylací aktivují IRF3 <sup>179</sup> a také E3-ubikvitin ligázu Peli1, která k-63 polyubikvitinuje protein RIP1 (následně je zřejmě také indukována hybridní M1 polyubikvitinace přes LUBAC) <sup>114,180</sup>. Polyubikvitinové řetězce na RIP1 následně fungují

analogicky MyD88 dependentní signalizaci jako lešení pro vazbu další interagujících partnerů, jmenovitě komplexů IKK a TAK-TAB<sup>181</sup>. Po zformování signalosomu indukují proteiny TBK1 a IKKé fosforylaci TAK1 a od ní odvislou klasickou cestu aktivace NF-κB a aktivaci kináz MAP<sup>182,183</sup>.



Obr. 7: Schematický model TLR dependentní signalizace. Signalizace začíná dimerizací TLR a interakcí jejich TIR domén s adaptorovými proteiny. U MyD88 závislé signalizace následuje formace myddosomu složeného z proteinů MyD88, IRAK4, IRAK1/IRAK2, která ústí v aktivaci TRAF6. Ten vytváří lešení polyubikvitinových řetězců, které zajišťují interakci s komplexy TAK-TAB a IKK. Tato interakce vede k označení a odbourání IκB a aktivaci NF-κB, a k aktivaci kináz MAP a následně transkripčních faktorů, například AP-1 nebo CREB<sup>184</sup>. TRAF6 navíc indukuje aktivaci IRF5. U TRIF dependentní signalizace dochází ke vzniku signalosomu obsahujícího mimo jiné proteiny TRAF3, PELi1, TBK1 a RIP1. PELi1 vytváří polyubikvitinové řetězce na RIP1, ty fungují jako lešení pro interakci s komplexem IKK. Tato interakce vede k aktivaci klasické NF-κB cesty. TBK1 pak zajišťuje aktivaci IRF3 fosforylací. Převzato a upraveno<sup>175</sup>.

## 4. Toll-like receptory

Toll-like receptory jsou nejzásadnější dosud objevené receptory pro rozeznávání konzervovaných patogenních vzorů. Uplatňují se hlavně v rámci vrozené imunity<sup>185</sup>, ale také jako propojení mezi imunitou vrozenou a získanou, jsou zásadním kostimulačním signálem u APC (antigen presenting cell)<sup>125</sup>. A účastní se i modulace samotné imunity získané<sup>186</sup>. Je známo 12 paralogů TLR u myši TLR 1-9 a TLR 11-13<sup>187,188</sup> a 10 paralogů u člověka TLR 1-10<sup>189,190</sup>. Na základě sekvenčních homologií můžeme rodinu Toll-like receptorů rozdělit do 7 podrodin a to TLR1, 2, 6, 10, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, 8, 9 a TLR11, 12, 13. O poslední z nich existuje zatím pouze malé množství informací, a proto nebude v dalším textu rozebírána<sup>191</sup>.

Buňky vrozeného imunitního systému jsou schopny rozeznávat konzervované antigenní vzory patogenů, například lipopolysacharid z buněčné stěny gramnegativních bakterií. Je-li tento injikován do organismu, způsobuje silné, mnohdy šokové imunitní reakce a v kombinaci s jinými antigeny vykazuje silné imunostimulační účinky. Až do 90. let minulého století ovšem nebyl znám mechanismus této percepce. Průlom přišel se zjištěním, že proteiny rodiny Toll u *Drosophily* zajišťující v rané ontogenezi ustanovení dorsoventrální osy<sup>192</sup>, slouží v dospělosti jako receptory imunitního systému. Tyto jsou navíc homologní lidskému receptoru pro interleukin 1, IL-1R<sup>193,194</sup>. Po tomto zjištění se v očích vědců začala rýsovat idea prastarého, evolučně konzervovaného imunitního systému využívaného pro detekci antigenních částic od *Drosophily* až po *Hominidae*, který už předtím nastínil C.A. Janeway<sup>195</sup>. Rozpoutal se hon za objevem nové rodiny receptorů. Nejprve byl naklován gen pro hToll a potvrzena jeho předpovězená role v imunitním systému<sup>125</sup>, následně bylo identifikováno 5 homologů pojmenovaných TLR1-5<sup>196</sup>. Avšak stále zůstávala otevřená otázka ligandů receptorů, bez níž nemohl další výzkum pokračovat. Odpověď na ni našel profesor Beutler, který prováděl studie na kmenech myši neresponzivních k LPS. U nich nejprve prokázal bodovou mutaci/deleci v genu *tlr4* a poté potvrdil, že je tato zodpovědná za neresponzivní fenotyp<sup>197</sup>. Defakto tak ustanovil TLR4 jako receptor pro LPS a tím započal jednu z velmi plodných kapitol molekulární biologie, výzkum signalizace TLR.

Strukturně jsou TLR poměrně konzervované. Skládají se z N-terminální LRR domény, transmembránového helixu a C-terminální TIR domény. LRR doména receptorů je složená z 19–25 LLR motivů bohatých na leucin, typických pravidelným rozmístěním hydrofobních a variabilních zbytků – konsensus sekvence LxxLxLxxNxL<sup>191</sup>. V prostoru má díky tomuto rozmístění doména tvar cívky stočené jako podkova. Konzervované hydrofobní zbytky míří dovnitř do proteinu a zodpovídají za konformační stabilitu, variabilní zbytky naopak míří směrem ven z proteinu a účastní se rozeznání ligandů. Pro stabilitu proteinů je ještě navíc zásadní síť vodíkových můstků mezi konzervovanými asparaginy. Centrem proteinu je konkávní strana podkovy tvořená  $\beta$ -skládanými listy, za jejichž formaci zodpovídají v rámci primární struktury konzervované zbytky. Konvexní strana vykazuje větší variabilitu v závislosti na daném proteinu, i když většinou zde nacházíme krátké  $3_{10}$   $\alpha$ -helixy a paralelní obrátky<sup>198</sup>. Cytoplazmatická část receptoru zodpovědná za nukleaci signalosomu je tvořena doménou TIR. Tato

konzervovaná struktura je složená 5 z centrálních  $\beta$ -skládaných listů obklopených z každé strany 5  $\alpha$ -helixy. Po dimerizaci LLR domén a navázání ligandu, dochází k dimerizaci a aktivaci TIR domén, a to dosud neobjasněným mechanismem<sup>199</sup>. Aktivované TIR domény poté vstupují do homotypických TIR-TIR interakcí s adaptérovými proteiny, které zodpovídají za správné a specifické zformování signalizačního komplexu<sup>200</sup>. Receptory vždy využívají vybranou kombinaci adaptorových proteinů, typicky pro daný subtyp. Dosud bylo objeveno 5 těchto proteinů, jsou jimi MAL, TRAM, SARM a výše zmiňované proteiny MyD88 a TRIF. Adaptér MAL zajišťuje vazbu komplexů TLR2 a TLR4 a signalozomů obsahujících MyD88<sup>201,202</sup>, adaptér TRAM fascilituje vazbu TRIF a TLR4 (případně TLR2)<sup>203,204</sup>, a SARM, asociující s MyD88 i s TRIF, slouží jako negativní regulátor TLR signalizace<sup>205,206</sup>.

Pro správné fungování signalizace je velmi důležité přesné lokalizování jednotlivých subtypů receptorů v rámci buňky. Lokalizace slouží jako další z os dělení rodiny TLR receptorů na dvě skupiny, tj. TLR lokalizované primárně na extracelulárním povrchu buňky – TLR 1, 2, 5, 6<sup>207</sup> a skupiny lokalizované primárně intracelulárně a to TLR 3, 7, 8, 9<sup>208,209</sup>. Tato lokalizace má alespoň u skupiny intracelulárních několik zásadních funkcí. Jsou jimi zajištění rozkladu a úpravy antigenních částic před detekci<sup>210</sup>. Zajištění aktivace antivirových TLR pouze cizorodou DNA, po nahrazení TM a TIR domén TLR9 doménami TLR4 byl tento hybrid lokalizován na povrchu makrofágů a rozeznával nikoli virovou, ale vlastní DNA<sup>211</sup>. A také zajištění aktivace IRF3 dráhy pouze endosomálními receptory. Toho je pravděpodobně dosaženo zanedbatelnou koncentrací TRAF3 v okolí membrány. Bylo prokázáno, že po cíleném lokalizování TRAF3 do prostoru membrány mohou využít IRF3 cestu i jiné TLR<sup>212</sup>. TLR2 může být ve specifických situacích aktivován v endolysosomu, a stane-li se tak využívá v aktivaci IRF3 dráhy proteiny TRAM, TRIF, MyD88 a TRAF3<sup>213,214</sup>. Samotné třídění TLR začíná již v endoplasmatickém retikulu, a u alespoň u části TLR podléhá pod kontrolu lokalizačních sekvencí přítomných v proteinu<sup>211,215</sup> TLR zde nejprve dosahují správného složení za pomoci chaperonů, jako jsou PRAT4A<sup>216</sup> a gp96<sup>217</sup>, a poté podléhají exportu. Ten je u intracelulárních TLR kontrolován chaperonem UNC93B1<sup>218</sup>. Důležitá je následně i pozice receptorů v rámci samotné membrány, ta je heterogenní a vykazuje existenci oblastí bohatších na sfingolipidy a cholesterol, které se nazývají lipidické rafty<sup>219</sup>. S lipickými rafty je spojována funkce řady proteinů TLR signalizace, například TLR4<sup>220</sup> a nebo proteinu MAL, který v lipidickém raftu interaguje s PtdIns(4,5)P<sub>2</sub><sup>221</sup>.

V mikroglíích jsou TLR receptory exprimovány poměrně universálně, s největším podílem TLR2 a TLR3<sup>222</sup>. Výraznější expresi receptorů z populace mikroglíí vykazují hlavně ty lokalizované v okolí mozkových komor a obalů<sup>223</sup>. TLR receptory exprimují i astrocyty a oligodendrocyty a to TLR1-4<sup>222</sup>. Signalizace spojená s TLR receptory je klíčová pro kontrolu fenotypu mikroglíální aktivity<sup>25</sup>, a to hlavně prostřednictvím indukce produkce prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-1 $\beta$ <sup>224</sup>, TNF -  $\alpha$ <sup>225</sup> a IL-6<sup>226</sup>.

## 4.1. TLR 1, 2, 6, 10

Nejzásadnějším receptorem této podrodiny je TLR2, který v antigenní detekci predominantně kooperuje s receptory TLR1 a TLR6. Společně rozpoznávají hlavně bakteriální lipoproteiny, TLR1/TLR2 detekuje primárně triacyl lipopeptidy a TLR2/TLR6 diacyl lipopeptidy. Receptory se v klidovém stavu s největší pravděpodobností vyskytují alespoň v nízké koncentraci ve formě dimerů, které se aktivují po interakci s ligandem<sup>199</sup>. Vazba TLR2 s partnery výrazně navyšuje potenciál rozsahu detekovaných částic, ale u obou zachovává uniformní signalizaci<sup>227</sup>. Komplexy TLR2 rozeznávají také například kyselinu lipoteichoovou<sup>228</sup>, korové proteiny a serinovou proteázu hepatitidy C<sup>229</sup>, LPS<sup>230</sup> a nebo endogenní ligandy spojené s poškozením tkáně jako  $\beta$ -defensin-3<sup>231</sup> a fragmenty kyseliny hyaluronové<sup>232</sup>. Zdá se, že hlavním místem lokalizace receptorových komplexů TLR2 je cytoplazmatická membrána, nacházejí se ovšem i v endosomech<sup>207</sup>. Navíc existují důkazy, že v populacích monocytů mohou po lokalizaci do endosomů interagovat s adaptéry TRAM a TRIF a aktivovat IRF3<sup>203</sup>. Posledním ze skupiny je TLR10, v myším modelu je po retrovirové inzerci přítomen pouze jako pseudogen, což činilo jeho výzkum dlouho velmi problematickým<sup>233</sup>. Dnes již víme, že slouží s největší pravděpodobností k detekci dsRNA v endosomech<sup>234</sup>, a to s inhibičním účinkem na obě dráhy TLR signalizace. Toho je dosaženo dosud neznámým mechanismem<sup>235</sup>. Byla prokázána jeho přímá kompetice s TLR3, a inhibiční interakce s komplexem zahrnujícím MyD88-IRF7<sup>234</sup>.

## 4.2. TLR 3

TLR3 je jediným TLR, který signalizuje pouze skrz interakci s adaptérem TRIF<sup>236</sup>. V klidovém stavu je lokalizován v endoplazmatickém retikulu, a po internalizaci ligandu migruje pod kontrolou chaperonu UNC93B1 do endosomů, kde rozeznává konzervované virové dsRNA vzory<sup>208,218</sup>.

## 4.3. TLR 4

Největší věhlas z rodiny si TLR4 získal díky svému významu v detekci lipopolysacharidů Gramnegativních bakterií. TLR4 sám s lipopolysacharidy přímo neinteraguje, využívá k tomu LPS vazebný protein MD-2. Ten se nejprve váže k monomeru receptoru, následně interaguje s molekulou LPS a celý komplex se váže k dalšímu monomeru MD-2/TLR4, což indukuje dimerizaci TIR domén TLR4 a iniciaci signalizace<sup>237</sup>. Ke zprostředkování vazby LPS k MD-2 jsou zapotřebí dva další proteiny, LPB a CD14. LBP interaguje s micelami LPS v roztoku a nakládá z nich LPS na proteiny CD14, které následně přenáší vždy po molekule LPS mezi LBP a dimery MD-2/TLR4<sup>238</sup>. Za fyziologických podmínek cykluje komplex TLR4/MD-2/CD14 mezi Golgiho aparátem a cytoplazmatickou membránou. Komplex se ustaví v cytoplazmatické membráně až ve chvíli zahájení signalizace<sup>239</sup>. Zhruba 15 minut od zahájení MyD88 dependentní signalizace dochází pod vlivem CD14 k endocytóze komplexu TLR4<sup>240</sup>. Vlivem endocytózy dojde ke snížení koncentrace PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> v membráně<sup>241</sup>, což způsobí odvázaní molekul adaptéru MAL, dosud vázaného v lipidickém raftu<sup>221</sup>. Uvolněné receptorové komplexy se poté vážou k adaptérům TRAM a TRIF a je zahájena TRIF dependentní dráha<sup>212</sup>. Signalizace TLR4 je díky tomu rozdělena na dvě časově oddělené fáze, první,

kteřá využívá MAL/MyD88 a je charakteristická silnou aktivací IKK a MAPK a fází pozdní kontrolovanou TRAM/TRIF pro níž je typická slabší aktivace IKK a MAPK<sup>165</sup>. Zeslabení signalizace nastává v pozdních endosomech po interakci s proteinem TAG, sestřizenou variantou TRAM, TAG rozrušuje TRIF signalozom a indukuje odbourání TLR4<sup>242</sup>. TLR4 rozeznává kromě LPS také endogenní signály, například proteiny tepelného šoku<sup>243</sup> nebo oligosacharidy hyaluronové kyseliny<sup>244</sup>.

#### 4.4. TLR 5

TLR5 je lokalizován na cytoplazmatické membráně a zastává detekci vzorů na bakteriálním flagelinu, konzervovaných napříč eubakteriemi. Interaguje s MyD88 a nejspíš také s TRIF, a je významný hlavně v imunitě střeva (Choi et al. 2010; Rhee et al. 2008). Velmi zajímavá je jeho možná kooperace ve formaci signalosomu TLR4, kterou naznačuje recentní studie<sup>247</sup>.

#### 4.5. TLR 7, 8, 9

Toll-like receptory 7, 9 zodpovídají hlavně za antivirovou imunitu. V klidovém stavu jsou lokalizovány v endoplasmatickém retikulu a po internalizaci ligandu migrují do endosomů, stejně jako TLR3 pod kontrolou UNC93B1<sup>218</sup>, navíc vyžadují sestřih od rezidentních proteinů<sup>248,249</sup>. TLR7 rozeznává guanosin a ssRNA s uridinem<sup>250</sup> a TLR9 nemethylované úseky CG DNA<sup>251</sup>. TLR8 je lokalizován endosomálně, také vyžaduje sestřih od rezidentních proteinů<sup>209</sup>, a rozeznává molekuly ssRNA<sup>252</sup>. Po aktivaci signalizuje přes osu TAK1-IKK $\beta$ -IRF5, která ústí v produkci INF- $\beta$ <sup>253</sup>. Intracelulární TLR rozeznávají i řadu endogenních nukleových kyselin a hrají tak pravděpodobně roli v genezi autoimunitních onemocnění. Bylo prokázáno, že TLR3 rozeznává endogenní mRNA spojené s buněčnou smrtí<sup>254</sup>, TLR7, 8, 9 endogenní DNA v plazmatických dendritických buňkách po její internalizaci s komplexy protilátek<sup>215,255</sup>.

#### 4.6. Regulace TLR signalizace

TLR dependentní signalizace je regulována řadou různých mechanismů k zajištění adekvátní míry aktivace. Prakticky všechny klíčové molekuly kaskády interagují s negativními regulátory své funkce. Na úrovni receptorů jsou to hlavně jejich rozpustné sestřizené formy<sup>256,257</sup>, funkci MyD88 negativně regulují protein SARM<sup>205</sup> a také jeho vlastní sestřizená nefunkční forma<sup>56</sup>. TRIF regulují proteiny SARM<sup>206</sup> a TAG<sup>242</sup>. IRAK1 je cílem negativní regulace od proteinů TOLLIP<sup>258</sup> a IRAKM<sup>259</sup>. Aktivaci NF- $\kappa$ B potlačují třeba proteiny Bcl-3<sup>260</sup> nebo Nurr1<sup>261</sup>, IRF3 a IRF7 pak protein RAUL<sup>262</sup>. TRAF3 a TRAF6 jsou regulovány pomocí deubikvitináz jako je DUBA pro TRAF3<sup>263</sup> anebo A20<sup>264</sup> a CYLD<sup>265</sup> pro TRAF6. TLR dependentní signalizaci také tlumí aktivace inhibiční dráhy PI3K/PKB<sup>266</sup>. Mimo proteinových interakcí je také důležitá regulace stability mRNA jednotlivých členů kaskády, tu ovlivňují hlavně miRNA, například miRNA-19 pro TLR2<sup>267</sup>, miRNA-26a pro TLR3<sup>268</sup> nebo miR-155 pro MyD88<sup>269</sup>.

## 5. Patologie se zapojením mikrogliaálních TLR

Mikrogliaální detekce PAMPs a DAMPs se účastní mnoha různých patologií spojených se zánětem a degenerací CNS. TLR jsou zásadními PRRs v obraně před bakteriální infekcí. Například v případě pneumokokových infekcí dochází k zapojení TLR2 a TLR4<sup>270</sup>. A v případě meningokokové nákazy rozeznává komplex TLR1/TLR2 bakteriální porin<sup>271</sup>. V ochraně před virovými infekcemi je význam TLR signalizace dvouznačný, aktivace spojená s tvorbou prozánětlivých cytokinů odpověď alespoň částečně potlačuje, naopak aktivace cesty IRF tuto odpověď umocňuje. Například při infekci viru japonské encefalitidy je velmi důležitá vybalancovaná odpověď receptorů TLR3 a TLR4<sup>272</sup>. U viru herpes simplex, působí aktivace TLR2 škodlivě pro hostitele<sup>273</sup>. Také je díky tomu možná negativní modulace TLR dependentní odpovědi na virovou infekci skrz komensální bakterie, která má potenciál snižovat vedlejší poškození způsobené aktivovanými mikroglie<sup>274</sup>. TLR3 má navíc v mikroglích schopnost reaktivovat genom HIV<sup>275</sup>. Toll-like receptory se účastní také ochrany před prionovými infekcemi<sup>276,277</sup>, a ty TLR, které rozeznávají endogenní ligandy, hrají zásadní roli v signalizaci sterilního zánětu po fyzickém poškození CNS<sup>278</sup> a po hypoxii<sup>279</sup>. TLR4 navíc moduluje poškození CNS způsobené ethanolem<sup>280</sup>. Bylo prokázáno zapojení mikroglie v řadě neuropsychiatrických poruch. Například schizofrenie je spojována se zvýšenou aktivitou komplexů TLR4<sup>281</sup>. Ta je navýšena i u pacientů s bipolární poruchou, navíc zde dochází k potlačení TLR4 signalizace po podání lithia<sup>282</sup>. A je spojována s chronickým stresem<sup>283</sup> a to dokonce i sociálním<sup>284</sup>. TLR7 se účastní neuroinflammace v modelu depresivní poruchy<sup>285</sup>. Mikrogliaální TLR se také účastní řady degenerativních onemocnění. Patologie Alzheimerovy choroby je charakteristická tvorbou plaků špatně zformovaného amyloidu  $\beta$ , který není fagocytován mikroglie. V rané fázi choroby aktivované mikroglie úspěšně internalizují vznikající plaky a s postupujícím onemocněním tuto schopnost ztrácí, amyloid  $\beta$  se hromadí a vzniká sterilní zánět vedoucí k neurodegeneraci<sup>286</sup>. Jak vychytávání, tak následná inflamace jsou pod kontrolou komplexů receptorů TLR2<sup>287</sup> a TLR4<sup>288</sup>, který zde navíc tvoří atypický dimer TLR4/TLR6, který rozeznává amyloid  $\beta$  a jehož působení je spojováno s neurodegenerací<sup>289</sup>. V patogenezi Parkinsonovy choroby dochází k hromadění jiného proteinu, a to špatně složeného  $\alpha$ -synucleinu. I zde dochází vlivem tohoto hromadění k sterilnímu zánětu a degeneraci<sup>290</sup>. Některé formy  $\alpha$ -synucleinu jsou přímo ligandy TLR2<sup>290</sup>, který na jejich internalizaci spolupracuje s komplexem TLR4<sup>291</sup>. TLR se účastní i patogeneze roztroušené sklerózy, spojené s likvidací oligodendrocytů a jimi tvořených myelinových pochev<sup>292</sup>. Role mikrogliaální TLR signalizace v jejím vývoji je zatím nejasná<sup>40</sup>, ale pravděpodobně se jí účastní minimálně TLR2<sup>293</sup>.



## 6. Závěr

Tato práce shrnula poznatky o signalizaci TLR receptorů v mikroglíální populacích. Zapojení signalizačních kaskád TLR receptorů do funkčních systémů mikroglíí představuje klíčový prvek regulace činnosti CNS. MyD88 a TRIF dependentní signalizace ovlivňují mikroglíální fenotyp skrz aktivaci prozánětlivých transkripčních faktorů jako jsou NF- $\kappa$ B a AP-1 a s nimi spojenou expresi prozánětlivých cytokinů. Také signalizují v antivirové ochraně, a to aktivací transkripčních faktorů rodiny IRF. Děje indukované aktivací komplexů TLR receptorů se účastní celé řady patologií CNS, a s nimi spojená regulace je klíčová pro zachování fyziologického stavu CNS. I přes velké pokroky, jež učily úspěšné vědecké týmy za poslední 3 desetiletí, je celkový význam TLR signalizace v komplexních organismech stále nejasný. Další výzkum by měl být zaměřen hlavně na pochopení vztahů mezi jednotlivými signalizačními drahami, neboť jen přes pochopení celé komplexity systému můžeme účinně indukovat kýžené změny patologických stavů.

## 7. Reference

1. \* Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M. & Kettenmann, H. (2016) The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* **64**, 1801–1840.
2. Levtova, N., Healy, L. M., Gonczi, C. M. C., Stopnicki, B., Blain, M., Kennedy, T. E., Moore, C. S., Antel, J. P. & Darlington, P. J. (2017) Comparative morphology and phagocytic capacity of primary human adult microglia with time-lapse imaging. *J. Neuroimmunol.* 310:143-149
3. Rezaie, P., Patel, K. & Male, D. K. (1999) Microglia in the human fetal spinal cord - Patterns of distribution, morphology and phenotype. *Dev. Brain Res.* **115**, 71–81.
4. Lawson, L. J., Perry, V. H. & Gordon, S. (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**, 405–415.
5. Roumier, A., Béchade, C., Poncer, J.-C., Smalla, K.-H., Tomasello, E., Vivier, E., Gundelfinger, E. D., Triller, A. & Bessis, A. (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J. Neurosci.* **24**, 11421–8.
6. Ferrini, F. & De Koninck, Y. (2013) Microglia control neuronal network excitability via BDNF signalling. *Neural Plast.* **2013**, 429815.
7. Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H. J. & Meyermann, R. (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* **101**, 249–255.
8. Feng, L., Murugan, M., Bosco, D. B., Liu, Y., Peng, J., Worrell, G. A., Wang, H. L., Ta, L. E., Richardson, J. R., Shen, Y. & Wu, L. J. (2019) Microglial proliferation and monocyte infiltration contribute to microgliosis following status epilepticus. *Glia* **67**, 1434–1448.
9. Boje, K. M. & Arora, P. K. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res.* **587**, 250–256.
10. Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C. & Fontana, A. (1987) Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon- $\gamma$ -treated microglial cells. *Eur. J. Immunol.* **17**, 1271–1278.
11. van Horssen, J., Singh, S., van der Pol, S., Kipp, M., Lim, J. L., Peferoen, L., Gerritsen, W., Kooi, E.-J., Witte, M. E., Geurts, J. J., de Vries, H. E., Peferoen-Baert, R., van den Elsen, P. J., van der Valk, P. & Amor, S. (2012) Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J. Neuroinflammation* **9**, 602.
12. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M. & Merad, M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841–5.
13. Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D. N., Luckow, B., Brocker, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F. & Prinz, M. (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* **16**, 273–280.
14. Jones, E. A. V. (2011) The initiation of blood flow and flow induced events in early vascular development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 1028–1035.
15. Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S. & Merad, M. (2013) Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* **38**, 792–804.
16. O’Koren, E. G., Mathew, R. & Saban, D. R. (2016) Fate mapping reveals that microglia and recruited monocyte-derived macrophages are definitively distinguishable by phenotype in the retina. *Sci. Rep.* **6**, 20636.
17. Priller, J., Prinz, M., Heikenwalder, M., Zeller, N., Schwarz, P., Heppner, F. L. & Aguzzi, A. (2006) Early and rapid engraftment of bone marrow-derived microglia in scrapie. *J. Neurosci.*

- 26, 11753–62.
18. **Varvel, N. H., Grathwohl, S. A., Baumann, F., Liebig, C., Bosch, A., Brawek, B., Thal, D. R., Charo, I. F., Heppner, F. L., Aguzzi, A., Garaschuk, O., Ransohoff, R. M. & Jucker, M. (2012)** Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 18150–18155.
  19. **Chinnery, H. R., Ruitenbergh, M. J. & McMenamin, P. G. (2010)** Novel characterization of monocyte-derived cell populations in the meninges and choroid plexus and their rates of replenishment in bone marrow chimeric mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 896–909.
  20. **Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. (2000)** M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm 1. *J Immunol*, **164** (12), 6166-6173
  21. **Li, J., Gran, B., Zhang, G. X., Ventura, E. S., Siglienti, I., Rostami, A. & Kamoun, M. (2003)** Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J. Neurol. Sci.* **215**, 95–103.
  22. **Cuesta, N., Salkowski, C. A., Thomas, K. E. & Vogel, S. N. (2003)** Regulation of Lipopolysaccharide Sensitivity by IFN Regulatory Factor-2. *J. Immunol.* **170**, 5739–5747.
  23. **da Silva, M. D., Bobinski, F., Sato, K. L., Kolker, S. J., Sluka, K. A. & Santos, A. R. S. (2014)** IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. *Mol. Neurobiol.* **51**, 19–31.
  24. **Taylor, R. A., Chang, C.-F., Goods, B. A., Hammond, M. D., Mac Grory, B., Ai, Y., Steinschneider, A. F., Renfroe, S. C., Askenase, M. H., McCullough, L. D., Kasner, S. E., Mullen, M. T., Hafler, D. A., Love, J. C. & Sansing, L. H. (2017)** TGF- $\beta$ 1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. *J. Clin. Invest.* **127**, 280–292.
  25. **Lively, S. & Schlichter, L. C. (2018)** Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN $\gamma$ +TNF $\alpha$ ) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 1–19.
  26. **Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. & Mosser, D. M. (2006)** Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **80** (6), 1298-307
  27. **Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., Ulas, T. & Schultze, J. L. (2014)** Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* **40**, 274–288.
  28. **\* Ransohoff, R. M. (2016)** A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.* **19**, 987–991.
  29. **\* Martinez, F. O. & Gordon, S. (2014)** The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *FI000Prime Rep.* **6**, 1–13.
  30. **\* Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J.-L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J. A., Vogel, S. N. & Wynn, T. A. (2014)** Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20.
  31. **Soltys, Z., Ziaja, M., Pawlinski, R., Setkowicz, Z. & Janeczko, K. (2001)** Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.* **63**, 90–97.
  32. **Karperien, A., Ahammer, H. & Jelinek, H. F. (2013)** Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–18.
  33. **Vinet, J., van Weering, H. R., Heinrich, A., Kälin, R. E., Wegner, A., Brouwer, N., Heppner, F. L., van Rooijen, N., Boddeke, H. W. & Biber, K. (2012)** Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. *J. Neuroinflammation* **9**, 515.
  34. **Hinwood, M., Morandini, J., Day, T. A. & Walker, F. R. (2012)** Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* **22**, 1442–1454.
  35. **Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. (2005)** Resting microglial cells are highly

- dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314–8.
36. **Giulian, D. & Baker, T. (1986)** Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* **6**, 2163–2178.
  37. **Giulian, D. (1987)** Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **18**, 155–171.
  38. **Valentino, K. L. & Jones, E. G. (1981)** Morphological and immunocytochemical identification of macrophages in the developing corpus callosum. *Anat. Embryol. (Berl)*. **163**, 157–172.
  39. **Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C. J., Rochford, C. D. P., Brück, W. & Becher, B. (2006)** Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **116**, 456–464.
  40. **Hendrickx, D., Schuurman, K. G., Van Draanen, M., Hamann, J. & Huitinga, I. (2014)** Enhanced uptake of multiple sclerosis-derived myelin by THP-1 macrophages and primary human microglia. *J Neuroinflammation* **11**, 64.
  41. **Liu, Y., Hao, W., Letiembre, M., Walter, S., Kulanga, M., Neumann, H. & Fassbender, K. (2006)** Suppression of Microglial Inflammatory Activity by Myelin Phagocytosis: Role of p47-PHOX-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Neurosci.* **26**, 12904–12913.
  42. **Koss, K., Churchward, M. A., Tsui, C. & Todd, K. G. (2019)** In Vitro Priming and Hyper-Activation of Brain Microglia: an Assessment of Phenotypes. *Mol. Neurobiol.* **56**, 6409–6425.
  43. **Faulkner, J. R. (2004)** Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* **24**, 2143–2155.
  44. **Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A., Hanke, M., Himler, J., Bailey, M. T., Sheridan, J. F. & Godbout, J. P. (2008)** Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J. Neuroinflammation* **5**, 1–14.
  45. **Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M. & Godbout, J. P. (2009)** Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain. Behav. Immun.* **23**, 309–317.
  46. **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. & Janeway, C. A. (1998)** MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**, 253–258.
  47. **Miller, B. S. & Zandi, E. (2001)** Complete reconstitution of human I $\kappa$ B Kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKK $\gamma$  on the complex activity in the absence of stimulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 36320–36326.
  48. **Ve, T., Vajjhala, P. R., Hedger, A., Croll, T., Dimaio, F., Horsefield, S., Yu, X., Lavrencic, P., Hassan, Z., Morgan, G. P., Mansell, A., Mobli, M., O’Carroll, A., Chauvin, B., Gambin, Y., Sierrecki, E., Landsberg, M. J., Stacey, K. J., Egelman, E. H. & Kobe, B. (2017)** Structural basis of TIR-domain-assembly formation in MAL- and MyD88-dependent TLR4 signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 743–751.
  49. **Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D. V. (1996)** TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443–446.
  50. **Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G. & Li, X. (2004)** Toll-like receptor 3-mediated activation of NF- $\kappa$ B and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 3533–3538.
  51. **Abdollahi, A., Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A. (1991)** Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: A novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* **6**, 165–167.
  52. **Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M. (1997)** IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. *Science (80-. )*. **278**, 1612–1615.
  53. **Loiarro, M., Gallo, G., Fantò, N., De Santis, R., Carminati, P., Ruggiero, V. & Sette, C. (2009)** Identification of critical residues of the MyD88 death domain involved in the recruitment of downstream kinases. *J. Biol. Chem.* **284**, 28093–28103.
  54. **Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Orii, K. E., Li, A., Kimura, T., Hiroaki, H., Kondo, N. & Shirakawa, M. (2009)** Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 10260–10265.

55. **Moncrieffe, M. C., Bollschweiler, D., Li, B., Penczek, P. A., Hopkins, L., Bryant, C. E., Klenerman, D. & Gay, N. J. (2020)** MyD88 Death-Domain Oligomerization Determines Myddosome Architecture: Implications for Toll-like Receptor Signaling. *Structure* **28**, 281-289.e3.
56. **Janssens, S., Burns, K., Vercammen, E., Tschopp, J. & Beyaert, R. (2003)** MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF- $\kappa$ B- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett.* **548**, 103–107.
57. **Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R. & Tschopp, J. (2003)** Inhibition of Interleukin 1 Receptor/Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* **197**, 263–268.
58. \* **Ullah, M. O., Sweet, M. J., Mansell, A., Kellie, S. & Kobe, B. (2016)** TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 27–45.
59. **Funami, K., Sasai, M., Ohba, Y., Oshiumi, H., Seya, T. & Matsumoto, M. (2007)** Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *J. Immunol.* **179**, 6867–72.
60. **Mahita, J. & Sowdhamini, R. (2017)** Integrative modelling of TIR domain-containing adaptor molecule inducing interferon- $\beta$  (TRIF) provides insights into its autoinhibited state. *Biol. Direct* **12**, 1–15.
61. **Natl, P., Cao, Z., Henzel, W. J. & Gao, X. (2011)** A Kinase Associated with the IRAK : Interleukin-1 Receptor. **271**, 1128–1131.
62. **Pelle, Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R. & Cao, Z. (1999)** IRAK-M Is a Novel Member of the IRAK-M Is a Novel Member of the Pelle / Interleukin-1 Receptor-associated Kinase ( IRAK ) Family **274**, 19403–19410.
63. **Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J. & Wesche, H. (2002)** IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5567–5572.
64. **Wang, L., Qiao, Q., Ferrao, R., Shen, C., Hatcher, J. M., Buhrlage, S. J., Gray, N. S. & Wu, H. (2017)** Crystal structure of human IRAK1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 13507–13512.
65. **Kuglstatter, A., Villaseñor, A. G., Shaw, D., Lee, S. W., Tsing, S., Niu, L., Song, K. W., Barnett, J. W., Browner, M. F., Shaw, D., Lee, S. W. & Tsing, S. (2015)** IL-1 Receptor-Associated Kinase 4 Structures Reveal Novel Features and Multiple Conformations, *J Immunol*, **178**(5), 2641-5
66. **Du, J., Nicolaes, G. A. F., Kruijswijk, D., Versloot, M., Poll, T. Van Der & Veer, C. Van. (2015)** The structure function of the death domain of human IRAK-M. *Cell Commun Signal.*, **7**;12:77
67. **Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaja, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y. & Wu, H. (2002)** Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* **418**, 443–447.
68. **Mosalos, G., Birkenbacht, M., Yalamanchill, R., Van Arsdale, T., Ware, C. & Kleff, E. (1995)** The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**, 389–399.
69. **Ishida, T., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Yamamoto, T., Inoue, J.-I., Aizawa, S., Watanabe, T., Mizushima, S.-I., Mosialos, G. & Kieff, E. (1996)** Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor- associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* **271**, 28745–28748.
70. **Sax, J. K. & El-Deiry, W. S. (2003)** Identification and characterization of the cytoplasmic protein TRAF4 as a p53-regulated proapoptotic gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 36435–36444.
71. **Cai, X., Du, J., Liu, Y., Xia, W., Liu, J., Zou, M., Wang, Y., Wang, M., Su, H. & Xu, D. (2013)** Identification and characterization of receptor-interacting protein 2 as a TNFR-associated factor 3 binding partner. *Gene* **517**, 205–211.
72. **Nakano, H., Oshima, H., Williams-abbott, L., Ware, C. F., Yagita, H. & Okumura, K. (1996)** Communication TRAF5 , an Activator of NF- B and Putative Signal Transducer for the Lymphotoxin- $\beta$  Receptor. *Biochemistry* **1**, 14661–14664.

73. **Xu, L. G., Li, L. Y. & Shu, H. B. (2004)** TRAF7 Potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP Activation and Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 17278–17282.
74. **Nakhaei, P., Mesplede, T., Solis, M., Sun, Q., Zhao, T., Yang, L., Chuang, T. H., Ware, C. F., Lin, R. & Hiscott, J. (2009)** The E3 ubiquitin ligase Triad3A negatively regulates the RIG-I/MAVS signaling pathway by targeting TRAF3 for degradation. *PLoS Pathog.* **5**, 1–14.
75. **Vyncke, L., Bovijn, C., Pauwels, E., Van Acker, T., Ruysinck, E., Burg, E., Tavernier, J. & Peelman, F. (2016)** Reconstructing the TIR Side of the Myddosome: A Paradigm for TIR-TIR Interactions. *Structure* **24**, 437–447.
76. **Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A. M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M. A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A. C., Jackson, D. B., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B. & Superti-Furga, G. (2004)** A physical and functional map of the human TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Nat. Cell Biol.* **6**, 97–105.
77. **Niu, F., Ru, H., Ding, W., Ouyang, S. & Liu, Z. J. (2013)** Structural biology study of human TNF receptor associated factor 4 TRAF domain. *Protein Cell* **4**, 687–694.
78. **Kim, C. M., Choi, J. Y., Bhat, E. A., Jeong, J. H., Son, Y. J., Kim, S. & Park, H. H. (2016)** Crystal structure of TRAF1 TRAF domain and its implications in the TRAF1-mediated intracellular signaling pathway. *Sci. Rep.* **6**, 1–10.
79. **Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E. & Matsumoto, K. (1996)** TAB1 : An activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- $\beta$  signal transduction. *Science (80-. )*. **272**, 1179–1182.
80. **Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J. & Matsumoto, K. (2000)** TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* **5**, 649–658.
81. **Ishitani, T., Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Shibuya, H., Gaynor, R. B. & Matsumoto, K. (2003)** Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J.* **22**, 6277–6288.
82. **Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A. & Fukui, S. (2009)** Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3. *EMBO J.* **28**, 3903–3909.
83. **Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y. & Han, J. (2002)** MAPKK-independent activation of p38 $\alpha$  mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38 $\alpha$ . *Science (80-. )*. **295**, 1291–1294.
84. **Chen, W., White, M. A. & Cobb, M. H. (2002)** Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 49105–49110.
85. **Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. I. & Chen, Z. J. (2001)** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346–351.
86. **Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Dérizard, B. & Davis, R. J. (1996)** MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1247–1255.
87. **Pattison, M. J., Mitchell, O., Flynn, H. R., Chen, C. S., Yang, H. T., Hakem, B. A., Boeing, S., Snijders, A. P. & Ley, S. C. (2016)** TLR and TNF-R1 activation of the MKK3/MKK6-p38 $\alpha$  axis in macrophages is mediated by TPL-2 kinase. *Biochem. J.* **473**, 2845–2861.
88. **Roget, K., Ben-Addi, A., Mambole-Dema, A., Gantke, T., Yang, H.-T., Janzen, J., Morrice, N., Abbott, D. & Ley, S. C. (2012)** I $\kappa$ B Kinase 2 Regulates TPL-2 Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 by Direct Phosphorylation of TPL-2 Serine 400. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4684–4690.
89. **Beinke, S., Robinson, M. J., Hugunin, M. & Ley, S. C. (2004)** Lipopolysaccharide Activation of the TPL-2/MEK/Extracellular Signal-Regulated Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Is Regulated by I $\kappa$ B Kinase-Induced Proteolysis of NF- $\kappa$ B1 p105. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9658–9667.
90. **Waterfield, M., Jin, W., Reiley, W., Zhang, M. & Sun, S.-C. (2004)** I $\kappa$ B Kinase Is an Essential Component of the Tpl2 Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6040–6048.

91. **Alagbala Ajibade, A., Wang, Q., Cui, J., Zou, J., Xia, X., Wang, M., Tong, Y., Hui, W., Liu, D., Su, B., Wang, H. Y. & Wang, R. F. (2012)** TAK1 Negatively Regulates NF- $\kappa$ B and p38 MAP Kinase Activation in Gr-1 +CD11b + Neutrophils. *Immunity* **36**, 43–54.
92. **Sanjo, H., Nakayama, J., Yoshizawa, T., Fehling, H. J., Akira, S. & Taki, S. (2019)** Cutting Edge: TAK1 Safeguards Macrophages against Proinflammatory Cell Death. *J. Immunol.* **203**, 783–788.
93. **Li, K., Wang, M., Hu, Y., Xu, N., Yu, Q. & Wang, Q. (2016)** TAK1 knockdown enhances lipopolysaccharide-induced secretion of proinflammatory cytokines in myeloid cells via unleashing MEKK3 activity. *Cell. Immunol.* **310**, 193–198.
94. **Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. & Ichijo, H. (1998)** Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**, 2596–2606.
95. **Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. & Ichijo, H. (2005)** ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* **6**, 587–592.
96. **Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J. I. & Ichijo, H. (2005)** Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**, 37033–37040.
97. **Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., Walker, C., Cheng, J., Liu, Z. G. & Su, B. (2004)** Differential regulation of interleukin 1 receptor and toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat. Immunol.* **5**, 98–103.
98. **Hale, K. K., Trollinger, D., Rihaneck, M. & Manthey, C. L. (1999)** Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J. Immunol.* **162**, 4246–52.
99. **Zhang, L., Zhang, J., Jiang, X., Yang, L., Zhang, Q., Wang, B., Cui, L. & Wang, X. (2020)** Hydroxytyrosol Inhibits LPS-Induced Neuroinflammatory Responses via Suppression of TLR-4-Mediated NF- $\kappa$ B P65 Activation and ERK Signaling Pathway. *Neuroscience* **426**, 189–200.
100. **Waetzig, V., Czeloth, K., Hidding, U., Mielke, K., Kanzow, M., Brecht, S., Goetz, M., Lucius, R., Herdegen, T. & Hanisch, U. R. (2005)** c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* **50**, 235–246.
101. **Dérillard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. & Davis, R. J. (1994)** JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025–1037.
102. **Chwang, W. B., Arthur, J. S., Schumacher, A. & Sweatt, J. D. (2007)** The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J. Neurosci.* **27**, 12732–12742.
103. **Zhao, C., Wang, P., Si, T., Hsu, C. C., Wang, L., Zayed, O., Yu, Z., Zhu, Y., Dong, J., Tao, W. A. & Zhu, J. K. (2017)** MAP Kinase Cascades Regulate the Cold Response by Modulating ICE1 Protein Stability. *Dev. Cell* **43**, 618–629.e5.
104. **Cavalli, V., Vilbois, F., Corti, M., Marcote, M. J., Tamura, K., Karin, M., Arkinstall, S. & Gruenberg, J. (2001)** The stress-induced MAP kinase p38 regulates endocytic trafficking via the GDI:Rab5 complex. *Mol. Cell* **7**, 421–432.
105. **Peroval, M. Y., Boyd, A. C., Young, J. R. & Smith, A. L. (2013)** A Critical Role for MAPK Signalling Pathways in the Transcriptional Regulation of Toll Like Receptors. *PLoS One* **8**, 51243.
106. **Laesen, J. K., Yamboliev, I. A., Weber, A. L. & Gerthoffer, W. T. (1997)** Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **273**, L930–40.
107. **Cai, B., Chang, S. H., Becker, E. B. E., Bonni, A. & Xia, Z. (2006)** p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of Bim EL at Ser-65. *J. Biol. Chem.* **281**, 25215–25222.
108. **Sen, R. & Baltimore, D. (1986)** Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705–716.
109. **Baeuerle, P. A. & Baltimore, D. (1988)** I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription

- factor. *Science (80- )*. **242**, 540–546.
110. **Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. & Maniatis, T. (1994)** The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* **78**, 773–785.
  111. **Roth, S., Stein, D. & Nüsslein-Volhard, C. (1989)** A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189–1202.
  112. \* **Smale, S. T. (2012)** Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF- $\kappa$ B family of transcription factors. *Immunol. Rev.* **246**, 193–204.
  113. **Lenardo, M., Pierce, J. W. & Baltimore, D. (1987)** Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility. *Science (80- )*. **236**, 1573–1577.
  114. **Emmerich, C. H., Ordureau, A., Strickson, S., Arthur, J. S. C., Pedrioli, P. G. A., Komander, D. & Cohen, P. (2013)** Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15247–15252.
  115. **Ni, C.-Y., Wu, Z.-H., Florence, W. C., Parekh, V. V., Arrate, M. P., Pierce, S., Schweitzer, B., Van Kaer, L., Joyce, S., Miyamoto, S., Ballard, D. W. & Oltz, E. M. (2008)** Cutting Edge: K63-Linked Polyubiquitination of NEMO Modulates TLR Signaling and Inflammation In Vivo. *J. Immunol.* **180**, 7107–7111.
  116. **Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F. & Green, D. R. (2002)** The lymphotoxin- $\beta$  receptor induces different patterns of gene expression via two NF- $\kappa$ B pathways. *Immunity* **17**, 525–535.
  117. **Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D. M., Grewal, I. S., Cochran, A. G., Gordon, N. C., Yin, J. P., Starovasnik, M. A. & Dixit, V. M. (2002)** BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF- $\kappa$ B2. *Immunity* **17**, 515–524.
  118. **Novack, D. V., Yin, L., Hagen-stapleton, A., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. (2003)** The I $\kappa$ B Function of NF- $\kappa$ B2 p100 Controls Stimulated Osteoclastogenesis, *J Exp Med.* **198** (5), 771–781.
  119. **Coope, H. J., Atkinson, P. G. P., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M. J., Klaus, G. G. B., Johnston, L. H. & Ley, S. C. (2002)** CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52. *EMBO J.* **21**, 5375–5385.
  120. **Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. & Karin, M. (2001)** Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science (80- )*. **293**, 1495–1499.
  121. **Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W. Z., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A. A., Bergsagel, P. L. & Karin, M. (2008)** Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF- $\kappa$ B signaling. *Nat. Immunol.* **9**, 1364–1370.
  122. **Liang, C., Zhang, M. & Sun, S. C. (2006)**  $\beta$ -TrCP binding and processing of NF- $\kappa$ B2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell. Signal.* **18**, 1309–1317.
  123. **Müller, J. R. & Siebenlist, U. (2003)** Lymphotoxin  $\beta$  receptor induces sequential activation of distinct NF- $\kappa$ B factors via separate signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 12006–12012.
  124. **Xiao, G., Fong, A. & Sun, S. C. (2004)** Induction of p100 processing by NF- $\kappa$ B-inducing kinase involves docking I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) to p100 and IKK $\alpha$ -mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 30099–30105.
  125. **Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. (1997)** A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397.
  126. **Blonska, M., Shambharkar, P. B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B. & Lin, X. (2005)** TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 43056–43063.
  127. **Sun, L., Deng, L., Ea, C. K., Xia, Z. P. & Chen, Z. J. (2004)** The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell* **14**, 289–301.
  128. **Schuman, J., Chen, Y., Podd, A., Yu, M., Liu, H. H., Wen, R., Chen, Z. J. & Wang, D. (2009)** A critical role of TAK1 in B-cell receptor-mediated nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Blood*



- 113, 4566–4574.
129. **Abbott, D. W., Yang, Y., Hutti, J. E., Madhavarapu, S., Kelliher, M. A. & Cantley, L. C. (2007)** Coordinated Regulation of Toll-Like Receptor and NOD2 Signaling by K63-Linked Polyubiquitin Chains. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6012–6025.
  130. **Adli, M., Merkhofer, E., Cogswell, P. & Baldwin, A. S. (2010)** IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  each function to regulate NF- $\kappa$ B activation in the TNF-induced/canonical pathway. *PLoS One* **5**, 1–7.
  131. **Zhang, J., Clark, K., Lawrence, T., Peggie, M. W. & Cohen, P. (2014)** An unexpected twist to the activation of IKK $\beta$ : TAK1 primes IKK $\beta$  for activation by autophosphorylation. *Biochem. J.* **461**, 531–537.
  132. **Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. & Maniatis, T. (1995)** Signal-induced site-specific phosphorylation targets I $\kappa$ B $\alpha$  to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**, 1586–1597.
  133. **Lopez-Pelaez, M., Lamont, D. J., Peggie, M., Shpiro, N., Gray, N. S. & Cohen, P. (2014)** Protein kinase IKK $\beta$ -catalyzed phosphorylation of IRF5 at Ser462 induces its dimerization and nuclear translocation in myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17432–17437.
  134. **Solt, L. A., Madge, L. A., Orange, J. S. & May, M. J. (2007)** Interleukin-1-induced NF- $\kappa$ B activation is NEMO-dependent but does not require IKK $\beta$ . *J. Biol. Chem.* **282**, 8724–8733.
  135. **Solt, L. A., Madge, L. A. & May, M. J. (2009)** NEMO-binding domains of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  regulate I $\kappa$ B kinase complex assembly and classical NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 27596–27608.
  136. **Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M. (1987)** Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729–739.
  137. **Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. & Tjian, R. (1987)** Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science (80- )*. **238**, 1386–1392.
  138. **Chiu, R., Boyle, W. J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T. & Karin, M. (1988)** The c-fos protein interacts with c-Jun AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**, 541–552.
  139. **Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J. & Karin, M. (1997)** Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3094–3102.
  140. **Hai, T. & Curran, T. (1991)** Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3720–3724.
  141. **Glover, J. N. M. & Harrison, S. C. (1995)** Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos–c-Jun bound to DNA. *Nature* vol. 373 257–261.
  142. **Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. & Leder, P. (1988)** c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* **55**, 917–924.
  143. **Jin, C., Li, H., Murata, T., Sun, K., Horikoshi, M., Chiu, R. & Yokoyama, K. K. (2002)** JDP2, a Repressor of AP-1, Recruits a Histone Deacetylase 3 Complex To Inhibit the Retinoic Acid-Induced Differentiation of F9 Cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4815–4826.
  144. **Park, J. Y., Chung, T. W., Jeong, Y. J., Kwak, C. H., Ha, S. H., Kwon, K. M., Abekura, F., Cho, S. H., Lee, Y. C., Ha, K. T., Magae, J., Chang, Y. C. & Kim, C. H. (2017)** Ascofuranone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response via nfkappab and ap-1, p-ERK, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in RAW 264.7 macrophages. *PLoS One* **12**, 1–14.
  145. **Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T. & Taniguchi, T. (1988)** Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- $\beta$  gene regulatory elements. *Cell* **54**, 903–913.
  146. **Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E. & Fujita, T. (1998)** Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: Activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J.* **17**, 1087–1095.
  147. **Dragan, A. I., Carrillo, R., Gerasimova, T. I. & Privalov, P. L. (2008)** Assembling the Human IFN- $\beta$  Enhanceosome in Solution. *J. Mol. Biol.* **384**, 335–348.
  148. **Takahashi, K., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Mori, M., Suhara, W., Okabe, Y., Fukuhara, Y., Terasawa, H., Akira, S., Fujita, T. & Inagaki, F. (2003)** X-ray crystal structure of IRF-3 and

- its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 922–927.
149. **Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T. & Hakoshima, T. (1999)** Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J.* **18**, 5028–5041.
  150. **Lin, R., Mamane, Y. & Hiscott, J. (1999)** Structural and Functional Analysis of Interferon Regulatory Factor 3: Localization of the Transactivation and Autoinhibitory Domains. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2465–2474.
  151. **Zhu, M., Fang, T., Li, S., Meng, K. & Guo, D. (2015)** Bipartite Nuclear Localization Signal Controls Nuclear Import and DNA-Binding Activity of IFN Regulatory Factor 3. *J. Immunol.* **195**, 289–297.
  152. **Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. & Golenbock, D. T. (2003)** LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- $\kappa$ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* **198**, 1043–1055.
  153. **Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S. I., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W. & Taniguchi, T. (2005)** Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243–249.
  154. **Au, W. C., Moore, P. A., Lowther, W., Juang, Y. T. & Pitha, P. M. (1995)** Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11657–11661.
  155. **Qin, B. Y., Liu, C., Lam, S. S., Srinath, H., Delston, R., Correia, J. J., Derynck, R. & Lin, K. (2003)** Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 913–921.
  156. **Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T. & Harrison, S. C. (2007)** Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation- dependent switch. *J. Biol. Chem.* **282**, 22816–22822.
  157. **Kumar, K. P., McBride, K. M., Weaver, B. K., Dingwall, C. & Reich, N. C. (2000)** Regulated Nuclear-Cytoplasmic Localization of Interferon Regulatory Factor 3, a Subunit of Double-Stranded RNA-Activated Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4159–4168.
  158. **Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N. & Taniguchi, T. (2000)** Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha/\beta$  gene induction. *Immunity* **13**, 539–548.
  159. **Honda, K., Yanai, H., Mizutani, T., Negishi, H., Shimada, N., Suzuki, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yeh, W. C. & Taniguchi, T. (2004)** Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15416–15421.
  160. **Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J. I., Uematsu, S., Takeuchi, O. & Akira, S. (2004)** Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat. Immunol.* **5**, 1061–1068.
  161. **Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., Ohara, O., Akira, S. & Kaisho, T. (2006)** I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  is critical for interferon- $\alpha$  production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* **440**, 949–953.
  162. **Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotsu, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005)** Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J. Exp. Med.* **201**, 915–923.
  163. **Balkhi, M. Y., Fitzgerald, K. A. & Pitha, P. M. (2008)** Functional Regulation of MyD88-Activated Interferon Regulatory Factor 5 by K63-Linked Polyubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 7296–7308.
  164. **Barnes, B. J., Field, A. E. & Pitha-Rowe, P. M. (2003)** Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 16630–16641.
  165. **Pauls, E., Nanda, S. K., Smith, H., Toth, R., Arthur, J. S. C. & Cohen, P. (2013)** Two Phases

- of Inflammatory Mediator Production Defined by the Study of IRAK2 and IRAK1 Knock-in Mice. *J. Immunol.* **191**, 2717–2730.
166. **Lin, S. & Lo, Y. (2010)** Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* **465**, 885–890 (2010).
  167. **Cushing, L., Stochaj, W., Siegel, M., Czerwinski, R., Dower, K., Wright, Q., Hirschfield, M., Casanova, J. L., Picard, C., Puel, A., Lin, L. L. & Rao, V. R. (2014)** Interleukin 1/Toll-like receptor-induced autophosphorylation activates interleukin 1 receptor-associated kinase 4 and controls cytokine induction in a cell type-specific manner. *J. Biol. Chem.* **289**, 10865–10875.
  168. **De Nardo, D., Balka, K. R., Gloria, Y. C., Rao, V. R., Latz, E. & Masters, S. L. (2018)** Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) plays a dual role in myddosome formation and Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **293**, 15195–15207.
  169. **Vollmer, S., Strickson, S., Zhang, T., Gray, N., Lee, K. L., Rao, V. R. & Cohen, P. (2017)** The mechanism of activation of IRAK1 and IRAK4 by interleukin-1 and Toll-like receptor agonists. *Biochem. J.* **474**, 2027–2038.
  170. **Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K. & Li, X. (2002)** Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase-Dependent IL-1-Induced Signaling Complexes Phosphorylate TAK1 and TAB2 at the Plasma Membrane and Activate TAK1 in the Cytosol. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7158–7167.
  171. **Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. & Chen, Z. J. (2000)** Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351–361.
  172. **Conze, D. B., Wu, C.-J., Thomas, J. A., Landstrom, A. & Ashwell, J. D. (2008)** Lys63-Linked Polyubiquitination of IRAK-1 Is Required for Interleukin-1 Receptor- and Toll-Like Receptor-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3538–3547.
  173. **Kishimoto, K., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. (2000)** TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J. Biol. Chem.* **275**, 7359–7364.
  174. **Cui, W., Xiao, N., Xiao, H., Zhou, H., Yu, M., Gu, J. & Li, X. (2012)**  $\beta$ -TrCP-Mediated IRAK1 Degradation Releases TAK1-TRAF6 from the Membrane to the Cytosol for TAK1-Dependent NF- $\kappa$ B Activation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 3990–4000.
  175. **Balka, K. R. & De Nardo, D. (2019)** Understanding early TLR signaling through the Myddosome. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 339–351.
  176. **Funami, K., Sasai, M., Oshiumi, H., Seya, T. & Matsumoto, M. (2008)** Homooligomerization is essential for Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated NF- $\kappa$ B and interferon regulatory factor-3 activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 18283–91.
  177. **Funami, K., Matsumoto, M., Obuse, C. & Seya, T. (2016)** 14-3-3-zeta participates in TLR3-mediated TICAM-1 signal-platform formation. *Mol. Immunol.* **73**, 60–68.
  178. **Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S. & Seya, T. (2010)** Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol. Immunol.* **47**, 1283–1291.
  179. **Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M. & Maniatis, T. (2003)** IKKE and TBKI are essential components of the IRF3 signalling pathway. *Nat. Immunol.* **4**, 491–496.
  180. **Chang, M., Jin, W. & Sun, S. C. (2009)** Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat. Immunol.* **10**, 1089–1095.
  181. **Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A. & Kelliher, M. A. (2005)** Rip1 mediates the trif-dependent Toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 36560–36566.
  182. **Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G. & Chen, Z. J. (2006)** Activation of IKK by TNF $\alpha$  Requires Site-Specific Ubiquitination of RIP1 and Polyubiquitin Binding by NEMO. *Mol. Cell* **22**, 245–257.
  183. **Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y. H., Deng, L. & Chen, Z. J. (2004)** TAB2 and TAB3 activate the NF- $\kappa$ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* **15**, 535–548.

184. **Mellett, M., Atzei, P., Jackson, R., O'Neill, L. A. & Moynagh, P. N. (2011)** Mal Mediates TLR-Induced Activation of CREB and Expression of IL-10. *J. Immunol.* **186**, 4925–4935.
185. **Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. & Van Noort, J. M. (2002)** Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 1013–1021.
186. **Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y. & Turka, L. A. (2004)** Toll-Like Receptor Ligands Directly Promote Activated CD4 + T Cell Survival. *J Immunol* vol. 172.
187. **Mishra, B. B., Gundra, U. M. & Teale, J. M. (2008)** Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J. Neuroinflammation* **5**, 1–11.
188. **Olson, J. K. & Miller, S. D. (2004)** Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J. Immunol.* **173**, 3916–3924.
189. **Jack, C. S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A. & Antel, J. P. (2005)** TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *J. Immunol.* **175**, 4320–4330.
190. **Verma, R. & Kim, J. Y. (2016)** 1,25-Dihydroxyvitamin Facilitates M2 Polarization and Upregulates TLR10 Expression on Human Microglial Cells. *Neuroimmunomodulation* **23**, 75–80.
191. **Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K. & Kuroki, Y. (2007)** Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* **8**,
192. **Schneider, D. S., Hudson, K. L., Lin, T. Y. & Anderson, K. V. (1991)** Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **5**, 797–807.
193. **Rosetto, M., Engström, Y., Baldari, C. T., Telford, J. L. & Hultmark, D. (1995)** Signals from the IL-1 receptor homolog, toll, can activate an immune response in a *drosophila* hemocyte cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 111–116.
194. **Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. & Hoffmann, J. A. (1996)** The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* **86**, 973–983.
195. **Janeway, C. A. (1989)**. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* vol. 54 1–13.
196. **Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. (1998)** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 588–593.
197. **Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. (1998)** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. *Science (80- )*. **282**, 2085–2088.
198. **Kajava, A. V. (1998)** Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**, 519–527.
199. **Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. & Lee, J. O. (2007)** Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* **130**, 1071–1082.
200. **Dunne, A., Ejdebäck, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A. J. & Gay, N. J. (2003)** Structural Complementarity of Toll/Interleukin-1 Receptor Domains in Toll-like Receptors and the Adaptors Mal and MyD88. *J. Biol. Chem.* **278**, 41443–41451.
201. **Fitzgerald, K. A., Palsson-Mcdermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A. & O'Neill, L. A. J. (2001)** Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78–83.
202. **Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. & Akira, S. (2002)** Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* **420**, 324–329.
203. **Nilsen, N. J., Vladimer, G. I., Stenvik, J., Orning, M. P. A., Zeid-Kilani, M. V., Bugge, M., Bergstroem, B., Conlon, J., Husebye, H., Hise, A. G., Fitzgerald, K. A., Espevik, T. & Lien, E. (2015)** A role for the adaptor proteins TRAM and TRIF in toll-like receptor 2 signaling. *J.*

- Biol. Chem.* **290**, 3209–3222.
204. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**, 1144–1150.
  205. Carlsson, E., Ding, J. L. & Byrne, B. (2016) SARM modulates MyD88-mediated TLR activation through BB-loop dependent TIR-TIR interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 244–253.
  206. Carty, M., Goodbody, R., Schröder, M., Stack, J., Moynagh, P. N. & Bowie, A. G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* **7**, 1074–1081.
  207. Nilsen, N. J., Deininger, S., Nonstad, U., Skjeldal, F., Husebye, H., Rodionov, D., von Aulock, S., Hartung, T., Lien, E., Bakke, O. & Espevik, T. (2008) Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 280–291.
  208. Kim, Y. M., Brinkmann, M. M., Paquet, M. E. & Ploegh, H. L. (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**, 234–238.
  209. Ishii, N., Funami, K., Tatematsu, M., Seya, T. & Matsumoto, M. (2014) Endosomal Localization of TLR8 Confers Distinctive Proteolytic Processing on Human Myeloid Cells. *J. Immunol.* **193**, 5118–5128.
  210. Chan, M. P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S. I., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G. N. & Miyake, K. (2015) DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat. Commun.* **6**, 1–10.
  211. Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 49–56.
  212. Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S. & Medzhitov, R. (2008) TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- $\beta$ . *Nat. Immunol.* **9**, 361–368.
  213. Petnicki-Ocwieja, T., Chung, E., Acosta, D. I., Ramos, L. T., Shin, O. S., Ghosh, S., Kobzik, L., Li, X. & Hua, L. T. (2013) TRIF mediates toll-like receptor 2-dependent inflammatory responses to borrelia burgdorferi. *Infect. Immun.* **81**, 402–410.
  214. Dietrich, N., Lienenklaus, S., Weiss, S. & Gekara, N. O. (2010) Murine Toll-Like Receptor 2 Activation Induces Type I Interferon Responses from Endolysosomal Compartments. *PLoS One* **5**.
  215. Christensen, S. R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. A. A. & Shlomchik, M. J. (2006) Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity* **25**, 417–428.
  216. Takahashi, K., Shibata, T., Akashi-Takamura, S., Kiyokawa, T., Wakabayashi, Y., Tanimura, N., Kobayashi, T., Matsumoto, F., Fukui, R., Kouro, T., Nagai, Y., Takatsu, K., Saitoh, S. I. & Miyake, K. (2007) A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J. Exp. Med.* **204**, 2963–2976.
  217. Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P. K., Zammit, D. J., Lefrançois, L. & Li, Z. (2007) Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity* **26**, 215–226.
  218. Lee, B. L., Moon, J. E., Shu, J. H., Yuan, L., Newman, Z. R., Schekman, R. & Barton, G. M. (2013) UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife* **2013**, 291.
  219. Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K. & Hörber, J. K. H. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997–1007.
  220. Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T. & Triantafilou, K. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* **115**, 2603–2611.
  221. Kagan, J. C. & Medzhitov, R. (2006) Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell* **125**, 943–955.
  222. Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. & van Noort, J. M. (2002) Broad Expression of Toll-Like

- Receptors in the Human Central Nervous System. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 1013–1021.
223. **Laflamme, N. & Rivest, S. (2001)** Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J.* **15**, 155–163.
  224. **Cui, J., Yu, S., Li, Y., Li, P. & Liu, F. (2018)** Direct binding of Toll-like receptor 4 to ionotropic glutamate receptor N-methyl-D-aspartate subunit 1 induced by lipopolysaccharide in microglial cells N9 and EOC 20. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 1323–1330.
  225. **Welser-Alves, J. V. & Milner, R. (2013)** Microglia are the major source of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in postnatal glial cultures; Regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochem. Int.* **63**, 47–53.
  226. **Burton, M. D., Sparkman, N. L. & Johnson, R. W. (2011)** Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. *J. Neuroinflammation* **8**, 54.
  227. **Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Röschmann, K., Jung, G., Wiesmüller, K.-H. & Ulmer, A. J. (2008)** Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 692–701.
  228. **Ellingsen, E., Morath, S., Flo, T., Schromm, A., Hartung, T., Thiemermann, C., Espevik, T., Golenbock, D., Foster, D., Solberg, R., Aasen, A. & Wang, J. (2002)** Induction of cytokine production in human T cells and monocytes by highly purified lipoteichoic acid: involvement of Toll-like receptors and CD14. *Med. Sci. Monit.* **8**.
  229. **Chang, S., Dolganiuc, A. & Szabo, G. (2007)** Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 479–487.
  230. **Spiller, S., Dreher, S., Meng, G., Grabiec, A., Thomas, W., Hartung, T., Pfeffer, K., Hochrein, H., Brade, H., Bessler, W., Wagner, H. & Kirschning, C. J. (2007)** Cellular recognition of trimyristoylated peptide or enterobacterial lipopolysaccharide via both TLR2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **282**, 13190–13198.
  231. **Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., Weinberg, A. & Sieg, S. F. (2007)** Human  $\beta$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18631–18635.
  232. **Scheibner, K. A., Lutz, M. A., Boodoo, S., Fenton, M. J., Powell, J. D. & Horton, M. R. (2006)** Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2. *J. Immunol.* **177**, 1272–1281.
  233. **Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. & Bates, E. E. M. (2005)** Human TLR10 Is a Functional Receptor, Expressed by B Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells, Which Activates Gene Transcription through MyD88. *J. Immunol.* **174**, 2942–2950.
  234. **Lee, S. M. Y., Yip, T. F., Yan, S., Jin, D. Y., Wei, H. L., Guo, R. T. & Peiris, J. S. M. (2018)** Recognition of double-stranded RNA and regulation of interferon pathway by toll-like receptor 10. *Front. Immunol.* **9**, 16.
  235. **Jiang, S., Li, X., Hess, N. J., Guan, Y. & Tapping, R. I. (2016)** TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. *J. Immunol.* **196**, 3834–3841.
  236. **Verstak, B., Arnot, C. J. & Gay, N. J. (2013)** An Alanine-to-Proline Mutation in the BB-Loop of TLR3 Toll/IL-1R Domain Switches Signalling Adaptor Specificity from TRIF to MyD88. *J. Immunol.* **191**, 6101–6109.
  237. **Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H. & Lee, J. O. (2009)** The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195.
  238. **Ryu, J. K., Kim, S. J., Rah, S. H., Kang, J. I., Jung, H. E., Lee, D., Lee, H. K., Lee, J. O., Park, B. S., Yoon, T. Y. & Kim, H. M. (2017)** Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity* **46**, 38–50.
  239. **Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Kurt-Jones, E. A., Golenbock, D. T. & Espevik, T. (2002)** Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct

- from the initiation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* **277**, 47834–47843.
240. **Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F. & Kagan, J. C. (2011)** CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868–880.
  241. **Botelho, R. J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J. D., Meyer, T. & Grinstein, S. (2000)** Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J. Cell Biol.* **151**, 1353–1367.
  242. **Palsson-McDermott, E. M., Doyle, S. L., McGettrick, A. F., Hardy, M., Husebye, H., Banahan, K., Gong, M., Golenbock, D., Espevik, T. & O’Neill, L. A. J. (2009)** TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat. Immunol.* **10**, 579–586.
  243. **Chase, M. A., Wheeler, D. S., Lierl, K. M., Hughes, V. S., Wong, H. R. & Page, K. (2007)** Hsp72 Induces Inflammation and Regulates Cytokine Production in Airway Epithelium through a TLR4- and NF- $\kappa$ B-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* **179**, 6318–6324.
  244. **Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. & Simon, J. C. (2002)** Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **195**, 99–111.
  245. **Choi, Y. J., Im, E., Chung, H. K., Pothoulakis, C. & Rhee, S. H. (2010)** TRIF mediates toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 37570–37578.
  246. **Rhee, S. H., Im, E. & Pothoulakis, C. (2008)** Toll-Like Receptor 5 Engagement Modulates Tumor Development and Growth in a Mouse Xenograft Model of Human Colon Cancer. *Gastroenterology* **135**,.
  247. **Hussain, S., Johnson, C. G., Scirba, J., Meng, X., Stober, V. P., Liu, C., Cyphert-Daly, J. M., Bulek, K., Qian, W., Solis, A., Sakamachi, Y., Trempus, C. S., Aloor, J. J., Gowdy, K. M., Foster, W. M., Hollingsworth, J. W., Tighe, R. M., Li, X., Fessler, M. B. & Garantziotis, S. (2020)** Tlr5 participates in the TLR4 receptor complex and promotes MyD88-dependent signaling in environmental lung injury. *Elife* **9**,.
  248. **Hipp, M. M., Shepherd, D., Gileadi, U., Aichinger, M. C., Kessler, B. M., Edelmann, M. J., Essalmani, R., Seidah, N. G., Reisesousa, C. & Cerundolo, V. (2013)** Processing of human toll-like receptor 7 by furin-like proprotein convertases is required for its accumulation and activity in endosomes. *Immunity* **39**, 711–721.
  249. **Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y. M. & Ploegh, H. L. (2008)** Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.* **9**, 1407–1414.
  250. **Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Krayukhina, E., Taoka, M., Yamauchi, Y., Tanji, H., Isobe, T., Uchiyama, S., Miyake, K. & Shimizu, T. (2016)** Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity* **45**, 737–748.
  251. **Ohto, U., Shibata, T., Tanji, H., Ishida, H., Krayukhina, E., Uchiyama, S., Miyake, K. & Shimizu, T. (2015)** Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9. *Nature* **520**, 702–705.
  252. **Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. (2004)** Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science (80-. )*. **303**, 1526–1529.
  253. **Bergström, B., Aune, M. H., Awuh, J. A., Kojen, J. F., Blix, K. J., Ryan, L., Flo, T. H., Mollnes, T. E., Espevik, T. & Stenvik, J. (2015)** TLR8 Senses *Staphylococcus aureus* RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN- $\beta$  Production via a TAK1–IKK $\beta$ –IRF5 Signaling Pathway. *J. Immunol.* **195**, 1100–1111.
  254. **Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. (2004)** mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* **279**, 12542–12550.
  255. **Christensen, S. R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Akira, S. & Shlomchik, M. J. (2005)** Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J. Exp. Med.* **202**, 321–331.
  256. **LeBouder, E., Rey-Nores, J. E., Rushmere, N. K., Grigorov, M., Lawn, S. D., Affolter, M., Griffin, G. E., Ferrara, P., Schiffrin, E. J., Morgan, B. P. & Labéta, M. O. (2003)** Soluble

- Forms of Toll-Like Receptor 2 Capable of Modulating TLR2 Signaling Are Present in Human Plasma and Breast Milk. *J. Immunol.* **171**, 6680–6689.
257. **Iwami, K., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T. & Yoshikai, Y. (2000)** Cutting Edge: Naturally Occurring Soluble Form of Mouse Toll-Like Receptor 4 Inhibits Lipopolysaccharide Signaling. *J. Immunol.* **165**, 6682–6686.
258. **Zhang, G. & Ghosh, S. (2002)** Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* **277**, 7059–7065.
259. **Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Janeway, C. A., Gala, J. E., Medzhitov, R., Flavell, R. A. & Haven, N. (2002)** IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling. **110**, 191–202.
260. **Carmody, R., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B. & Chen, Y. (2019)** Bcl-3 Inhibits Toll-like Receptor Signaling and Inflammation By Blocking NF-kB p50 Ubiquitination. *FASEB J.* **22**, 672.14-672.14.
261. **Saijo, K., Winner, B., Carson, C. T., Collier, J. G., Boyer, L., Rosenfeld, M. G., Gage, F. H. & Glass, C. K. (2009)** A Nurr1/CoREST Pathway in Microglia and Astrocytes Protects Dopaminergic Neurons from Inflammation-Induced Death. *Cell* **137**, 47–59.
262. **Yu, Y. & Hayward, G. S. (2010)** The Ubiquitin E3 Ligase RAUL Negatively Regulates Type I Interferon through Ubiquitination of the Transcription Factors IRF7 and IRF3. *Immunity* **33**, 863–877.
263. **Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R., Quan, C., O'Rourke, K. M., Eby, M., Pietras, E., Cheng, G., Bazan, J. F., Zhang, Z., Arnott, D. & Dixit, V. M. (2007)** DUBA: A deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science (80- )*. **318**, 1628–1632.
264. **Shembade, N., Ma, A. & Harhaj, E. W. (2010)** Inhibition of nf-kb signaling by a20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science (80- )*. **327**, 1135–1139.
265. **Sun, S. C. (2010)** CYLD: A tumor suppressor deubiquitinase regulating NF-B activation and diverse biological processes. *Cell Death and Differentiation* vol. 17 25–34.
266. **Tarassishin, L., Suh, H. S. & Lee, S. C. (2011)** Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J. Neuroinflammation* **8**, 187.
267. **Philippe, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Meyer, A., Georgel, P., Sibia, J., Wachsmann, D. & Pfeffer, S. (2012)** TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. *J. Immunol.* **188**, 454–461.
268. **Jiang, C., Zhu, W., Xu, J., Wang, B., Hou, W., Zhang, R., Zhong, N., Ning, Q., Han, Y., Yu, H., Sun, J., Meng, L. & Lu, S. (2014)** MicroRNA-26a negatively regulates toll-like receptor 3 expression of rat macrophages and ameliorates pristane induced arthritis in rats. *Arthritis Res. Ther.* **16**.
269. **Tang, B., Xiao, B., Liu, Z., Li, N., Zhu, E. D., Li, B. S., Xie, Q. H., Zhuang, Y., Zou, Q. M. & Mao, X. H. (2010)** Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation. *FEBS Lett.* **584**, 1481–1486.
270. **Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H., Wagner, H., Koedel, U. & Kirschning, C. J. (2008)** Innate Immunity to Pneumococcal Infection of the Central Nervous System Depends on Toll-Like Receptor TLR2 and TLR4. *J. Infect. Dis.* **198**, 1028–1036.
271. **Massari, P., Visintin, A., Gunawardana, J., Halmen, K. A., King, C. A., Golenbock, D. T. & Wetzler, L. M. (2006)** Meningococcal Porin PorB Binds to TLR2 and Requires TLR1 for Signaling. *J. Immunol.* **176**, 2373–2380.
272. **Han, Y. W., Choi, J. Y., Uyangaa, E., Kim, S. B., Kim, J. H., Kim, B. S., Kim, K. & Eo, S. K. (2014)** Distinct Dictation of Japanese Encephalitis Virus-Induced Neuroinflammation and Lethality via Triggering TLR3 and TLR4 Signal Pathways. *PLoS Pathog.* **10**, e1004319.
273. **Kurt-Jones, E. A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M. M., Knipe, D. M. & Finberg, R. W. (2004)** Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1315–1320.
274. **Brown, D. G., Soto, R., Yandamuri, S., Stone, C., Dickey, L., Gomes-Neto, J. C., Pastuzyn, E. D., Bell, R., Petersen, C., Buhrke, K., Fujinami, R. S., O'Connell, R. M., Stephens, W. Z., Shepherd, J. D., Lane, T. E. & Round, J. L. (2019)** The microbiota protects from viral-induced neurologic damage through microglia-intrinsic TLR signaling. *Elife* **8**, e47117.



275. **Alvarez-Carbonell, D., Garcia-Mesa, Y., Milne, S., Das, B., Dobrowolski, C., Rojas, R. & Karn, J. (2017)** Toll-like receptor 3 activation selectively reverses HIV latency in microglial cells. *Retrovirology* **14**,.
276. **Spinner, D. S., Cho, I. S., Park, S. Y., Kim, J. H., Meeker, H. C., Ye, X., LaFauci, G., Kerr, D. J., Flory, M. J., Kim, B. S., Kascsak, R. B., Wisniewski, T., Levis, W. R., Schuller-Levis, G. B., Carp, R. I., Park, E. & Kascsak, R. J. (2008)** Accelerated Prion Disease Pathogenesis in Toll-Like Receptor 4 Signaling-Mutant Mice. *J. Virol.* **82**, 10701–10708.
277. **Carroll, J. A., Race, B., Williams, K. & Chesebro, B. (2018)** Toll-like receptor 2 confers partial neuroprotection during prion disease. *PLoS One* **13**, e0208559.
278. **Hanafy, K. A. (2013)** The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J. Neuroinflammation* **10**, 83.
279. **Yao, L., Kan, E. M., Lu, J., Hao, A., Dheen, S. T., Kaur, C. & Ling, E. A. (2013)** Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: Role of TLR4 in hypoxic microglia. *J. Neuroinflammation* **10**, 785.
280. **Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M. & Guerri, C. (2009)** Critical Role of TLR4 Response in the Activation of Microglia Induced by Ethanol. *J. Immunol.* **183**, 4733–4744.
281. **García-Bueno, B., Gassó, P., MacDowell, K. S., Callado, L. F., Mas, S., Bernardo, M., Lafuente, A., Meana, J. J. & Leza, J. C. (2016)** Evidence of activation of the Toll-like receptor-4 proinflammatory pathway in patients with schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* **41**, E46–E55.
282. **Dong, H., Zhang, X., Dai, X., Lu, S., Gui, B., Jin, W., Zhang, S., Zhang, S. & Qian, Y. (2014)** Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced microglial activation via inhibition of toll-like receptor 4 expression by activating the PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *J. Neuroinflammation* **11**, 140.
283. **Gárate, I., Garcia-Bueno, B., Madrigal, J. L. M., Caso, J. R., Alou, L., Gomez-Lus, M. L., Micó, J. A. & Leza, J. C. (2013)** Stress-induced neuroinflammation: Role of the toll-like receptor-4 pathway. *Biol. Psychiatry* **73**, 32–43.
284. **Lehmann, M. L., Cooper, H. A., Maric, D. & Herkenham, M. (2016)** Social defeat induces depressive-like states and microglial activation without involvement of peripheral macrophages. *J. Neuroinflammation* **13**, 224.
285. **Alshammari, T. K., Alghamdi, H., Green, T. A., Niazy, A., Alkahdar, L., Alrasheed, N., Alhosaini, K., Alswayed, M., Elango, R., Laezza, F., Alshammari, M. A. & Yacoub, H. (2019)** Assessing the role of toll-like receptor in isolated, standard and enriched housing conditions. *PLoS One* **14**, 1–22.
286. **Huang Yu, W., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Näslund, J., Mathews, P. M., Cataldo, A. M. & Nixon, R. A. (2005)** Macroautophagy - A novel  $\beta$ -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **171**, 87–98.
287. **Richard, K. L., Filali, M., Préfontaine, P. & Rivest, S. (2008)** Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid  $\beta$ 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **28**, 5784–5793.
288. **Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., Manietta, N., Walter, J., Schulz-Schüffer, W. & Fassbender, K. (2007)** Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**, 947–956.
289. **Shmuel-Galia, L., Klug, Y., Porat, Z., Charni, M., Zarmi, B. & Shai, Y. (2017)** Intramembrane attenuation of the TLR4-TLR6 dimer impairs receptor assembly and reduces microglia-mediated neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **292**, 13415–13427.
290. **Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., Lee, S. J., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H. J. & Lee, S. J. (2013)** Neuron-released oligomeric  $\alpha$ -synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat. Commun.* **4**, 1562.
291. **Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G. K. & Stefanova, N. (2013)** Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* **61**, 349–360.
292. **Schirmer, L., Merkler, D., König, F. B., Brück, W. & Stadelmann, C. (2013)** Neuroaxonal Regeneration is More Pronounced in Early Multiple Sclerosis than in Traumatic Brain Injury

- Lesions. *Brain Pathol.* **23**, 2–12.
293. **Fujiwara, M., Anstadt, E. J., Flynn, B., Morse, K., Ng, C., Paczkowski, P., Zhou, J., Mackay, S., Wasko, N., Nichols, F. & Clark, R. B. (2018)** Enhanced TLR2 responses in multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* **193**, 313–326.

\* označuje sekundární citaci