

Toll-like reseptör 4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerinin romatoid artrit hastalarında araştırılması*

The investigation of Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly ve Thr399Ile polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis

Ebru Önalan Etem¹, Halit Elyas¹, Salih Özgöçmen², Arefe Yıldırım², Ahmet Gödekmerdan³, Deniz Erol¹, Cemil Çolak⁴

¹Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ

²Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Elazığ

³Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünloloji Anabilim Dalı, Elazığ

⁴Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü, Elazığ

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 1194 nolu proje ile desteklenmiştir.

Yazışma adresi:

Dr. Ebru Önalan Etem, Fırat University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, 23119, Elazig, TURKEY, Tel: 05056776937, +90 424 2370000/4656, E-mail: ebruuem@gmail.com
e-mail: drosogut@harran.edu.tr

Özet

Amaç: Romatoid artrit (RA)'in etyolojisinde makrofajlar ve dentritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin önemli bir rolü vardır. Antijen sunan hücreler Toll-like reseptör (TLR)'lere sahiptirler. Bu çalışma TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmleri ve RA arasında bir ilişki olup olmadığından belirlenmesi ve polimorfizmler ile romatoid faktör (RF), kollajen tip II, anti-RNP ve anti-CCP gibi otoantikor pozitiflikleri arasındaki ilişkilerin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve metod: Çalışmaya Amerikan Romatoloji Birliği kriterlerini karşılayan RA'lı 100 hasta ve 100 sağlıklı kontrol dahil edildi. TLR4 genindeki rs4986790 ve rs4986791 polimorfizmleri değerlendirildi. Otoantikorların serum konsantrasyonları kantitatif ELISA kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: TLR4 genindeki Asp299Gly ($p=0,02$) ve Thr399Ile ($p=0,05$) genotip sıklıkları hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gösterdi. Her iki allele sıklığının da hasta grubunda artmış olduğu belirlendi. TLR4 genotipleri ve otoantikor pozitiflikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Sonuçlar: TLR aracılı proinflamatuar sitokinlerin defektif üretimi RA'daki kronik inflamasyonun nedenlerinden biri olabilir. Çalışmada elde edilen verilerin doğrulanabilmesi için farklı toplumlarda RA riski açısından TLR gen polimorfizmlerinin incelenmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: polimorfizm, romatoid artrit, Toll-like reseptör.

Abstract

Background: There is an important role of antigen-presenting cells (APCs) such as macrophages and dendritic cells (DCs) in etiology of rheumatoid arthritis (RA). APCs have Toll-like receptors (TLRs). This study is conducted to evaluate whether TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are associated with RA and to detect the association between polymorphisms and levels of autoantibodies such as RF, collagen type II, anti-RNP and anti-CCP.

Methods: This study included 100 RA subjects diagnosed according to the American College of Rheumatology criteria and a control group of 100 healthy subjects. TLR4 gene rs4986790 and rs4986791 polymorphisms were evaluated. Serum concentrations of autoantibodies were measured using quantitative ELISA.

Results: TLR4 gene Asp299Gly ($p=0.02$) and Thr399Ile ($p=0.05$) genotype frequencies were significantly different between patient and control groups with increased frequency for both in patient group. We could not detect statistically significant association between the TLR4 genotypes and the autoantibody levels.

Conclusions: A defective release of proinflammatory cytokine by TLR may be responsible for chronic inflammation in RA. Further studies, especially in ethnically different populations are required to explore the role of TLR gene polymorphisms in the development of RA and to confirm our results.

Key words: polymorphism, rheumatoid arthritis, Toll-like receptor.

Giriş

Romatoid artrit sinovial eklemelerin kronik inflamasyonu ile karakterize otoimmün bir hastalık olup patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (1). Patogenezinde doğal ve adaptif immün sistemin önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir (2). Etyolojisinde Toll-like reseptörleri (TLR) eksprese eden makrofajlar ve dentritik hücreler gibi

antijen sunan hücrelerin büyük önemi vardır (3–5). Makrofaj ve dentritik hücreler üzerindeki TLR'ler, doğal immün sistemin aktivasyonunu sağlayarak proinflamatuar sitokinlerin salınmasına yol açmaktadır. Bu aktivasyon T ve B hücrelerini içeren adaptif immün cevabın gelişmesini uyarmaktadır. Adaptif immün cevabın gelişiminden sonra proinflamatuar sitokinler RA patogenezine doğrudan katkı

sağlayabilmektedir (2).

TLR'ler patojenle beraber görülen moleküler yapıları (PAMP; patogen associated molecular pattern) tanımladırlar. Bu reseptörler patojen抗原lerine bağlanmalarına karşın aynı zamanda self-antigenlere de bağlanabilirler (6). TLR reseptörlerinin aktivasyonu patojenlere karşı konukça cevabının ve otoimmün yanıtın oluşmasını sağlayabilmektedir (37). TLR4 geni 9q35 bölgesinde lokalizedir. Bu reseptör aktive olduğu zaman IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuar sitokinler salınmaktadır (7). Reseptör RA hastalarının inflamatuar sinovial eklemelerinde bol olarak bulunan heat shock proteinler, fibrinojen ve diğer bazı proteinlerle etkileşmektedir. Bu şekilde endojen ligandların sinovium veya sinovial sıvındaki抗原 sunan hücreler tarafından tanınmasıyla RA'nın başlatılabilceğini gösteren çalışmalar vardır (8). Son zamanlarda RA'da otoimmunitenin başlatılmasında TLR'lerin potansiyel rolleri ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmıştır (6). TLR4 geninde şu ana kadar 2 farklı polimorfizm tanımlanmıştır. TLR4 genindeki yanlış anlamlı mutasyon sonucu oluşan 2 polimorfizmden ilki başlangıç kodonundan 896. nükleotitte adeninin guanine substitüsüyonu sonucu 299. amino asid olan aspartik asidin glisinle yer değiştirmesi (Asp299Gly) ve diğeri 399. amino asitte threoninin izolösine yer değiştirmesi (Thr399Ile) şeklinde dir (9).

Çeşitli TLR gen polimorfizmleri ile infeksiyon ve inflamatuar hastalıklar arasında beraberlikler tespit edilmiştir (10). İnflamasyonun RA gelişimindeki rolü biliindiğinden TLR'lerin RA gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, RA hastalarında TLR 4 Asp299Gly ve Thr399Ile gen polimorfizmleri ile RA'da sık rastlanılan anti-heteronükleer ribonükleoprotein (anti-hnRNP), anti-cyclic citrullinated peptides (anti-CCP), romatoid faktör (RF) ve anti-kollejenaz tip II gibi otoantikorların pozitiflikleri arasındaki beraberlikleri araştırmayı amaçladık.

Materyal ve metod

Hasta popülasyonu

Hastalık tanısı Amerikan Romatizma Birliği'nin 1987'deki gözden geçirilmiş tanı kriterlerine göre konuldu. Buna göre en az 4 pozitif kriteri olan hastalar RA olarak kabul edildi. Klinik olarak eklemelerin durumunun değerlendirmesinde 52 periferik eklemde hareket sırasında oluşan ağrı ve hassasiyetin değerlendirildiği Ritchie artiküler indeks (RAI) kullanıldı (11,12). Değişik derecelerde hastalık aktivitesine sahip RA'lı 100 hasta çalışma grubuna dahil edildi. Kontrol grubu olarak benzer yaş grubunda olan ve 1. derece akrabalarında (bireyin ebeveynleri ve kardeşleri) veya kendisinde RA bulunmayan 100 birey kullanıldı. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubuna dahil edilen tüm bireyler bilgilendirilmiş hasta onam formunu imzaladı. Çalışma lokal etik komite tarafından onaylandı.

Genotipleme

Hastalardan ve kontrol grubundan EDTA'lı kan抽取液 3 cc kan alındı. DNA izolasyonu üretici firmannaya yöntemine uygun olarak hastaların periferik kan örneklerinden Wizard Genomik DNA izolasyon kiti (Promega Corp., Madison, USA) kullanılarak yapıldı. TLR4 Asp299Gly ve Thr399Ile polimorfizmlerin değerlendirilmesi için Lorenz ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı (13). Kisaca Thr399Ile için forward primer 5'-GGTGCTGTTCTAAAGTGATTGGAGAA-3' ve revers primer olarak 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTAAATGCT-3' kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyon (PZR) 95°C'de 4 dk, 95°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s olmak üzere toplam 30 döngü gerçekleştirildi. PZR sonrası oluşan ürünler Hinf I (Fermentas, USA) restriksiyon enzimiyle kesildi. Kesim sonrası wild tip (C allele) için 124 baz çifti (bç) ve mutant (T allele) için 98 + 26 bç'lik ürünler elde edildi. TLR4 Asp299Gly polimorfizminin değerlendirilmesi için forward primer olarak 5'- ATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' ve revers primer olarak 5'- GATCAACTCTGAAAAAGCATCCCAC-3' kullanıldı. PZR 95°C'de 4 dk, 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s olmak üzere toplam 30 döngü gerçekleştirildi. PZR ürünler Ncol (Fermentas, USA) restriksiyon enzimiyle kesildi ve %3,5'lük jelde yürütüldü. Restriksiyon enzim kesim sonrası wild tip (Asp) allele için 249 bç'lik ve polimorfik allele (Gly) için 23bç'lik azalmaya 196bç'lik ürün elde edildi (10).

Otoantikor ölçümü

Anti-RNP, anti-CCP, anti-kollojen tip II otoantikorlarının ölçümü için ELISA kitleri kullanıldı. Otoantikor ölçümü RNP için REAADS anti-RNP kit (Coragenix, Colorado, USA), CCP için Aeskulisa RA/ CP-Detect kit (Aesku, Wendelsheim, Germany) ve kollogen Tip II için Human IgG, anti-Human BioAssay ELISA kit (USBiological, Massachusetts, USA) kitleri ile üretici firmaların protokollerine uygun olarak yapıldı. Anti-RNP ve anti-kollejen tip II antikorlarının ölçümlü 96 hastada ve anti-CCP ölçümleri ise 91 hastada yapıldı.

İstatistik analizler

Tüm istatistiksel analizler Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi (The Statistical Package for the Social Sciences; SPSS) (SPSS, Chicago, IL) versiyon 10.0 ile yapıldı. RA'lı hastalarda ve kontrol grubunda genotip sıklıklarının dağılımı arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için Ki-Kare (veya Fischer's Exact) testi ve genotiplerle diğer demografik özellikler ve otoantikorlar arasındaki ilişkilerin saptanması için Spearman'ın korelasyon testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan sonuçlar anlamlı olarak değerlendirildi.

Bulgular

Çalışma grubunda 94 bayan ve 6 erkek vardı ve hastaların yaş ortalamaları 51 (min:24-maks:75)'di. Hastaların demografik ve klinik özellikleri Tablo 1'de verildi. Her iki polimorfizm restriksiyon enzim kesim yöntemiyle başarıyla genotiplendirildi. Şekil 1 ve 2'de Asp299Gly ve Thr399Ile

genotiplerinin agaroz jel görüntüleri gösterilmektedir. Hasta ve kontrol grubu arasında Asp299Gly (odds ratio, OR=3,2, %95 CI 1,2–8,5, p=0,02) ve Thr399lle allele (OR=2,5, %95 CI 1,04–6,11, p=0,05) sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edildi (Tablo 2 ve Tablo 3). Her iki allele sıklığının da hasta grubunda artmış olduğu belirlendi (Gly allele sıklığı hasta grubunda %17, kontrol grubunda %6, Thr399lle allele sıklığı hasta grubunda %18, kontrol grubunda %8). RA'lı hastaların 10'nunda Asp299Gly ve Thr399lle allellerinin beraber ayrıldığı belirlendi. Hastaların demografik özellikleri, DAS28, anti-RNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejen II gibi otoantikorlar pozitiflikleri ile TLR4 Asp299Gly ve Thr399lle genotipleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi. Anti-CCP açısından hastaların 64'ü (%70,3) pozitif ve 27'si (%29,7) negatif olarak değerlendirildi ve anti-CCP ile RAI arasında pozitif ilişki bulundu (p=0,03).

Tartışma

Çalışmamızda TLR4 genindeki Asp299Gly ve Thr399lle olmak üzere iki adet önemli fonksiyonel polimorfizmi değerlendirdik ve kontrolle karşılaştırıldığında bu polimorfizmlerin hasta grubunda artmış sıklığa sahip olduğunu tespit ettiğiz. Bilgilerimize göre çalışmamız Türk RA hastalarında TLR4 polimorfizmlerinin değerlendirildiği ve özellikle bu polimorfizmlerde otoantikor pozitiflikleri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı ilk çalışmадır.

RA ve TLR4 genindeki polimorfizmler arasındaki ilişkilerin çalışıldığı çalışmalarla oldukça farklı veriler elde edilmiştir. Sheedy ve arkadaşları TLR4 Asp299Gly polimorfizmini çalışmışlar ancak RA ve polimorfizm arasında ve TLR polimorfizm ile romatoid faktör (RF) veya anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) durumu veya radyolojik hasar arasında herhangi bir ilişki tespit edememişlerdir (14). Kilding ve arkadaşları da Asp299Gly polimorfizmini açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır (15). Sanchez ve arkadaşları RA hastalarında TLR4 Asp299Gly ve Thr399lle polimorfizmlerini incelemişler ve hastalığın demografik veya klinik parametreleriyle araştırılan polimorfizmler arasında herhangi bir ilişki olmadığını belirlemiştir (6). Radstake ve arkadaşları diğer çalışmaların tersine RA hastalarında yaptıkları çalışmada TLR4 Asp299Gly polimorfizminin hasta grubunda kontolle karşılaşıldığında daha az olduğunu tespit etmişlerdir (16). Kuuliala ve arkadaşları RA hastalarında TLR4 +896G alleleini taşıyan hastalarda tedavi cevabının bozulabileceği belirtmişlerdir (17). Biz diğer çalışmalarдан farklı olarak çalışmamızda TLR4 Asp299Gly genotip ve Gly alleleinin kontolle karşılaşıldığında hasta grubunun artmış sıklığa sahip olduğunu tespit ettiğiz. Ancak diğer çalışmalarla benzer şekilde hastalığın demografik ve klinik özellikleri veya DAS28, anti-hnRNP, anti-CCP, RF ve anti-kollejenaz II gibi otoantikor pozitiflikleri ile bu polimorfizm arasında herhangi bir ilişki tespit edemedik. Çalışmamızda elde edilen farklı bulguların en muhtemel açıklaması

polimorfizmlerin genellikle etnik gruplarda oldukça farklı sıklıklarda bulunması şeklinde olabilir. Polimorfizm çalışmaları popülasyon temelli yapılan çalışmalar olduğundan tüm popülasyonlar için bir genellemeye yapılamamaktadır.

Varyantların RA etyopatogenezinde nasıl bir rol oynadıkları tam olarak bilinmemekle beraber TLR4 varyant negatif RA'lı hastalarla karşılaşıldığında TLR4 varyant pozitif hastalarda CD14+ hücre sayısının ve RA hastalarının eklemlerinden elde edilen CD14+ makrofajları kontrol makrofajları ile karşılaşıldığında TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur (18,19). TLR4 Asp299Gly ve Thr399lle varyantlarına sahip RA'lı hastalarda CD14+ hücre sayısındaki artış hastalık gelişimine katkıda bulunan mekanizmalardan biri olabilir. Ayrıca, Asp299Gly varyantın ekzojen ve endojen ligandlara cevapta yetersiz sinyalizasyona neden olduğu belirtilmektedir (9, 20).

Dündar ve arkadaşları anti-CCP'yi 24 hastada (%64,9) pozitif, 13 hastada (%35,1) negatif bulmuşlardır (21). Çalışmamızda örneklerin %70,4'ünde anti-CCP pozitifliği tespit edilirken örneklerin %29,6'sında anti-CCP negatif olarak bulundu. Bu sonuç literatür ile uyumludur. Meyer ve arkadaşları RA'lı 191 hastayı beş yıl süre ile takip etmişler anti-CCP pozitif hastalarda radyolojik hasarın, erozyonların ve eklem darlığı gelişiminin üç kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (22). Çalışmamızda RAI ve anti-CCP arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmamıza rağmen anti-CCP pozitifliği ve DAS28 arasında bir ilişki bulmadık. Bu ilişkiyi araştırmak için daha geniş hasta grupları içeren yeni çalışmalar yapılmalıdır.

TLR4 sinyalizasyonu, varyant genotiplerin azalmış sitokin ekspresyonu ve artmış CD14+ hücre sayısına neden olarak adaptif immün yanıtın oluşmasında ve artritlerin patogenezinde erken dönemde önemli roller oynayabilir. Sonuç olarak çalışmamızda TLR4 varyant genotiplerinin sağlıklı kontolle karşılaşıldığında RA hastalarında artmış olduğunu tespit ettiğiz. TLR4 genindeki artmış Asp299Gly ve Thr399lle varyant sıklığının RA etyopatogenezinde rol oynayan mekanizmalardan biri olabileceğini düşünmektediyiz.

Teşekkür

Çalışmayı destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel araştırma projeleri birimine (1194 nolu proje) teşekkür ederiz.

Bu makale aşağıda adı geçen kongrede poster olarak sunulmuştur.

ETEM Ebru Önalan (Araş Gör.), ELYAS Halit (Prof.Dr.), ÖZGÖÇMEN Salih (Doç.Dr.), YILDIRIM Arefe (Uzm.Dr.), GÖDEKMERDAN Ahmet (Prof.Dr.), YÜCE Hüseyin (Yrd.Doç.Dr.). Toll-like reseptör 4 (TLR4) Genindeki Asp299Gly ve Thr399lle Polimofizmlerinin Türk Romatoid Artrit Hastalarında Değerlendirilmesi. P-100, 3. Ulusal Romatizmal Hastalıklar Kongresi. 14-18 Mayıs 2008. ANTALYA, Wow Kremlin Topkapı Palace

Tablo 1: Hastaların demografik ve klinik özelliklerini.

Demografik Özellik	Ortalama (N=100)	\pm	SD
Yaş (yıl, min-mak)	51,03 ± 12,4 (24-75)		
Cinsiyet (kadın/erkek)	94/6		
Hastalık süresi (yıl)	8,96 ± 7,11		
Sabah tutukluğu (dak)	0,98 ± 1,15		
ESR (mm/saat)	29,81 ± 24,20		
CRP (mg/L)	17,55 ± 24,96		
Hemoglobin (g/dl)	12,42 ± 1,47		
Romatoid Faktör (IU/ml)	186,85 ± 195,37		
Ritchie artiküler indeks (RAI)	16,23 ± 13,74		
DAS28	4,04 ± 1,41		

CRP: C-reaktif protein

DAS28:

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı

Min-mak: Minimum- maksimum

N: Sayı

SD: Standart sapma

Tablo 2: TLR4 Asp299Gly polimorfizm genotiplerinin hasta ve kontrol grubundaki dağılımları.

Genotipler	Asp/Asp(%)	Asp/Gly(%)	Gly/Gly(%)	p
Hasta	% 83	%17	%0	0,02
Kontrol	% 94	%6	%0	
Alleles	Thr	Ile		
Hasta	0,83	0,17		
Kontrol	0,94	0,06		

*: p<0,05

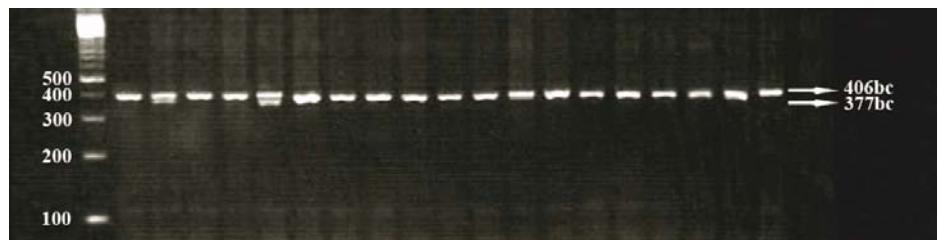
Tablo 3: TLR4 Thr399Ile polimorfizm genotiplerinin hasta (n=100) ve kontrol (n=100) grubundaki dağılımları.

Genotipler	Thr/Thr (%)	Thr/Ile (%)	Ile/Ile (%)	p
Hasta	% 82	%18	%0	0,05
Kontrol	% 92	%8	%0	
Alleles	Thr	Ile		
Hasta	0,82	0,18		
Kontrol	0,92	0,08		

*: p<0,05



Şekil 1: TLR4 genindeki Asp299Gly polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Markörü, Sütun2 ve 3: 249bç (Asp/Asp: wild örnek), Sütun4: 249bç+196bç (Asp/Gly: heterozigot örnek). D: Aspartik asit, G: Glisin.



Şekil 2: TLR4 genindeki Thr399Gly polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Markörü, Sütun 2: 406 bç (Thr/Thr: wild örnek), Sütun3: 406bç+377bç (Thr/Gly: heterozigot örnek). T: Treonin, G: Glisin.

Yazarlarla ilgili bildirilmesi gereken konular (Conflict of interest statement) : Yok (None)

Kaynaklar

- 1) Kowalski ML, Wolska A, Grzegorczyk J, et al. Increased responsiveness to toll-like receptor 4 stimulation in peripheral blood mononuclear cells from patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*: 2008; 2008: 1327–1332.
- 2) Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res*: 2005; 65(12): 5009–5014.
- 3) Barrera P, Blom A, van Lent PL, et al. Synovial macrophage depletion with clodronate containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*: 2000; 43(9):1951–1959.
- 4) Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne RW. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis: mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*: 1997; 40(1):5–18.
- 5) Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. *J Immunol*: 1994; 152(5):2613–2623.
- 6) Sánchez E, Orozco G, López-Nevot MA, Jiménez-Alonso J, Martín J. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*: 2004; 63(1):54–57.
- 7) Kormann MS, Depner M, Hartl D, et al. Toll-like receptor heterodimer variants protect from childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*: 2008; 122(1):86–92.
- 8) Lee EK, Kang SM, Paik DJ, Kim JM, Youn J. Essential roles of Toll-like receptor-4 signaling in arthritis induced by type II collagen antibody and LPS. *Int Immunopharmacol*: 2005; 17(3):325–333.
- 9) Arbour N, Lorenz E, Schutte B, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*: 2000; 25(2): 187–191.
- 10) Schroder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. *Lancet Infect Dis*: 2005; 5(3):156–164.
- 11) Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I. The American College of rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*: 1992; 35(5): 498–502.
- 12) Ritchie DM, Boyle JA, McInnes JM. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med*: 1968; 37(147):393–406.
- 13) Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res*: 2002; 52(3):373–376.
- 14) Sheedy FJ, Marinou I, O'Neill LA, Wilson AG. The Mal/TIRAP S180L and TLR4 G299D polymorphisms are not associated with susceptibility to or severity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*: 2008; 67(9): 1328–1331.
- 15) Kilding R, Akil M, Till S, et al. A biologically important single nucleotide polymorphism within the toll-like receptor-4 gene is not associated with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*: 2003; 21(3):340–342.
- 16) Radstake TR, Franke B, Hanssen S, et al. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum*: 2004; 50(3):999–1001.
- 17) Kuuliala K, Orpana A, Leirisalo-Repo M, et al. Polymorphism at position +896 of the toll-like receptor 4 gene interferes with rapid response to treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*: 2006 65(9):1241–1243.
- 18) Roelofs MF, Wenink MH, Toonen EJ, et al. The functional variant (Asp299Gly) of toll-like receptor 4 (TLR4) influences TLR4-mediated cytokine production in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*: 2008; 35(4):558–561.
- 19) Nozaki T, Roelofs MF, Takahashi K, Ishii O, et al. Development of an ex vivo cellular model of rheumatoid arthritis: critical role of CD14-positive monocyte/macrophages in the development of pannus tissue. *Arthritis Rheum*: 2007; 56(9):2875–2885.
- 20) Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*: 2004; 53(7):987–992.
- 21) Dündar Ü, Evcik D, Çakır T, Aktepe O, Altındış M, Kavuncu V. Romatoid Artrit Hastalarda Anti-Ccp Antikorlarının Hastalık Aktivitesi Ve Radyolojik Hasar İle İlişkisi. *Romatizma*: 2005;20(2):9–14.
- 22) Meyer O, Labarre C, Dougados M, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis*: 2003; 62(2): 120–126.