

## Mikrobiom und angeborene Immunität

# Wie der Toll-like-Rezeptor 5 die Immunantwort umgeht

SARA J. CLASEN, RUTH E. LEY  
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOLOGIE, TÜBINGEN

**Pattern recognition receptors, such as Toll-like receptor 5 (TLR5), bind conserved ligands produced by microbes and initiate pro-inflammatory responses. Both pathogens and commensals synthesize flagellin, the ligand to TLR5, to assemble flagella for motility. How the host tolerates flagellins produced by human gut commensals has remained unknown. This review describes flagellin-TLR5 interactions, including recent findings that show commensal-derived flagellins are silently recognized by TLR5.**

DOI: 10.1007/s12268-023-2017-5  
© Die Autorinnen 2023

■ Toll-like-Rezeptoren sind membrangebundene Sensoren des angeborenen Immunsystems für mikrobielle Moleküle. Durch ihre Bindung an Liganden aktivieren sie entzündungsfördernde Signalwege, einschließlich NF- $\kappa$ B, und steuern somit adaptive Immunreaktionen. Der Toll-like-Rezeptor 5 (TLR5) wird sowohl von Immun- als auch von Epithelzellen exprimiert, einschließlich der-

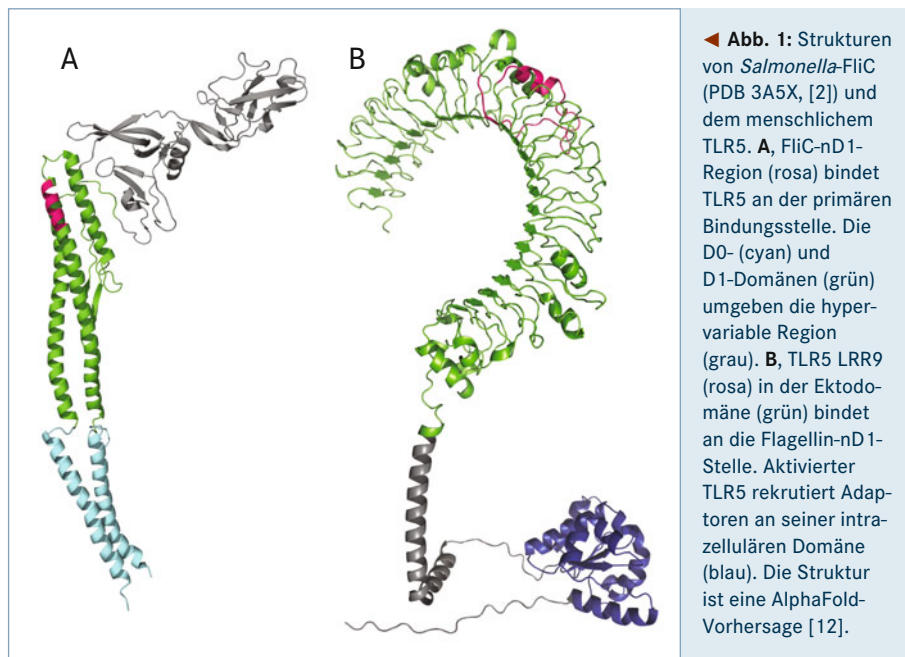
jenigen, die den Magen-Darm-Trakt auskleiden, und sein primärer Ligand ist das bakterielle Protein Flagellin [1]. Flagellin-Monomere werden von Bakterien zu langen Filamenten zusammengesetzt, die die Beweglichkeit ermöglichen. Die Struktur von Flagellin ist in allen bakteriellen Phyla ähnlich und besteht aus den hoch konservierten D0-D1-Domänen, welche eine hypervariable

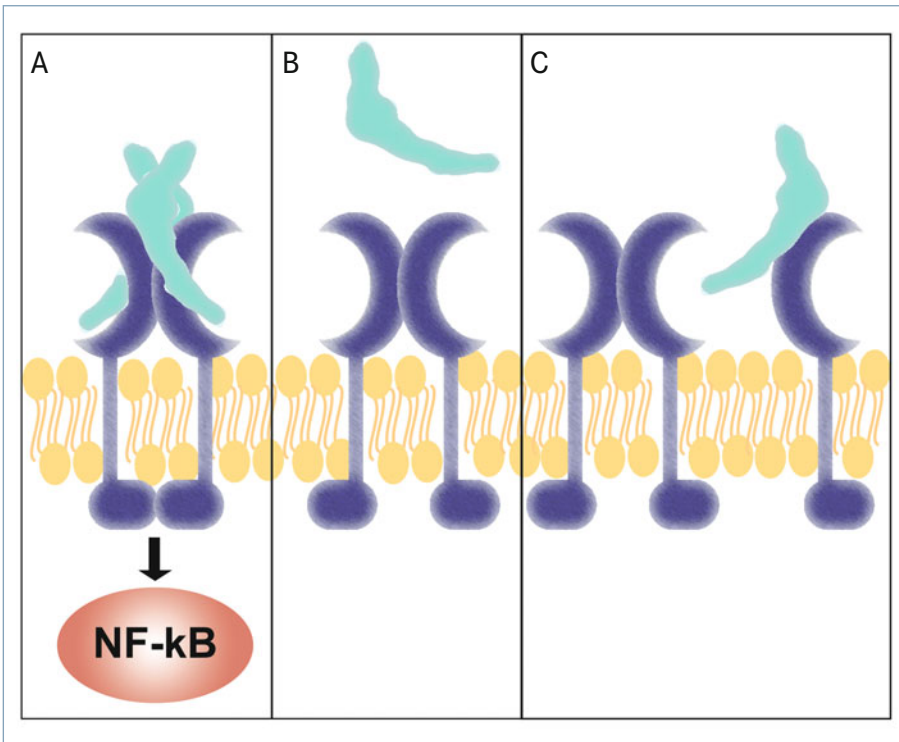
Region umgeben (**Abb. 1A**, [2]). Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit haben sich Pathogene und Darmbewohner so entwickelt, dass sie Flagelline produzieren, die die Aktivierung von TLR5 vermeiden. Diese Strategien werden im Folgenden beschrieben.

### Interaktion von Flagellin-TLR5

Wie alle Mitglieder der Familie der Toll-like-Rezeptoren bindet TLR5 seinen Liganden über eine hufeisenförmige Ektodomäne, die aus leucinreichen Wiederholungen (LRRs) besteht (**Abb. 1B**, [3]). TLR5 ist in der Plasmamembran lokalisiert und dessen Ektodomäne erstreckt sich in die extrazelluläre Umgebung, wo sie Flagellin bindet und einen 2:2-Flagellin:TLR5-Rezeptor-Komplex bildet [4]. Dieser Komplex aktiviert Signalkaskaden, indem Adaptorproteine rekrutiert werden, die an die intrazellulären Domänen von TLR5 binden (**Abb. 2A**).

Ein Großteil unseres Wissens darüber, wie Flagellin TLR5 aktiviert, stammt aus Arbeiten über das Flagellin FliC, das von dem Erreger *Salmonella enterica* produziert wird. FliC ist ein starker TLR5-Agonist, der bei niedrigen picomolaren Konzentrationen einen TLR5-abhängigen NF- $\kappa$ B-Reporter stimuliert. Es wird angenommen, dass die Bindung von FliC an TLR5 den Rezeptor aktiviert, indem eine Dimerisierung des Rezeptors induziert wird. Direkte Beweise für dieses Modell der Liganden-induzierten Dimerisierung fehlen jedoch zurzeit. Frühere Studien haben ergeben, dass FliC über seine konservierte nD1-Domäne an TLR5 bindet (**Abb. 1A**). Kristallstrukturdaten haben gezeigt, dass diese Region direkt mit dem LRR9 der TLR5-Ektodomäne in Kontakt steht (**Abb. 1B**, [4, 5]). Mutationen im Bereich dieser Bindestelle reduzieren den FliC-Agonismus um mehrere Größenordnungen, beeinträchtigen aber auch die FliC-Funktion, da diese Bakterien nicht mehr beweglich sind [5]. Dieser Befund untermauert die Idee, dass Bakterien nicht in der Lage sind, Flagelline zu entwickeln, die sich der TLR5-Immunabwehr entziehen, ohne dabei an Beweglichkeit einzubüßen.





▲ **Abb. 2:** Interaktionen zwischen TLR5 und Flagellin. **A,** FliC bindet TLR5-Dimere, um Aktivität zu induzieren. **B,** Ausweichende Flagelline können TLR5 aufgrund der Zerstörung der primären Schnittstelle oder der periplasmatischen Sequestrierung nicht binden, was zu keiner Aktivität führt. **C,** *Silent*-Flagelline binden TLR5-Monomere und vermeiden präformierte TLR5-Dimere, wodurch sie der TLR5-Aktivierung entgehen.

### Umgehen der TLR5-Immunantwort

Bekannte humanpathogene alpha- und epsilon-Proteobakterien, wie *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori*, umgehen jedoch den TLR5-Signalweg und bleiben dabei trotzdem beweglich [6, 7]. Diese Bakterien produzieren Flagelline mit mutierten nD1-Bindungsstellen, die ihre Fähigkeit, an TLR5 zu binden, verlieren (**Abb. 2B**, [6]). Es wird angenommen, dass kompensatorische Mutationen an anderer Stelle in der hypervariablen Region des Flagellins den Verlust der Motilität verhindern [8]. Da diese Flagelline nicht mehr mit der TLR5-Ektodomäne interagieren, können selbst mikromolare Konzentrationen keine Reaktion des Wirts hervorrufen.

Spirochäten wie *Leptospira interrogans* umgehen die Aktivierung von TLR5 ebenfalls, indem sie verhindern, dass ihr Flagellin an den Rezeptor bindet. Anstatt die nD1-Stelle zu mutieren, schließen diese ihre Flagelline im Periplasma ein und bilden Endoflagellen [9]. Diese physische Trennung von der extrazellulären Umgebung verhindert, dass Spirochäten-Flagelline TLR5 binden und damit aktivieren können.

### *silent*-Erkennung durch TLR5

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ausweichstrategien haben wir kürzlich einen weiteren Mechanismus identifiziert, mit dem Flagelline die Aktivierung von TLR5 vermeiden. Dies ergab sich dadurch, dass wir unseren Fokus auf Flagelline gelegt haben, die vom menschlichen Darmmikrobiom produziert werden. Der Rezeptor TLR5 wird stark in den Epithelzellen des Dickdarms exprimiert, aber Proteobakterien wie *Salmonellen* und *Helicobacter* sind im gesunden Darm eines Erwachsenen nur selten vorhanden. Um physiologisch relevante TLR5-Liganden zu untersuchen, überlegten wir zunächst, welche Bakterien hauptsächlich Flagelline haben. Dafür screeneten wir NGS-Reads aus den Metagenomen des menschlichen Darms auf Flagellin-Reads. Dabei stellte sich heraus, dass Mitglieder der Familie der Lachnospiraceae die Hauptquelle von Flagellin-DNA sind [10]. Weitere Analysen der Metatranskriptomik und Metaproteomik bestätigten, dass Flagelline der Familie Lachnospiraceae als Liganden für TLR5 im erwachsenen Darm dienen.

Dieses Ergebnis war überraschend, da Lachnospiraceae, insbesondere *Roseburia*-Arten aufgrund ihrer Rolle als Butyratproduzenten als vorteilhaft für die Gesundheit des Wirts angesehen werden [11]. Daher testeten wir, ob Flagelline von Lachnospiraceae proinflammatorische Signale über TLR5 auslösen. Wir haben 40 der häufigsten Flagelline, die in menschlichen Darmmetagenomen vorkommen, rekombinant exprimiert und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in TLR5-Reporterzellen gemessen. Während viele dieser aus Kommensalen stammenden Flagelline stark stimulierend wirken, sind einige von ihnen schlechte TLR5-Agonisten, die hohe nanomolare Konzentrationen benötigen, um eine Reaktion auszulösen [10]. Wir haben getestet, ob die schwachen Aktivatoren die Bindung an TLR5 umgehen, ähnlich wie die Flagelline von *H. pylori* und *C. jejuni*. In der Tat binden einige von ihnen den Rezeptor nicht. Andere jedoch zeigen keine Beeinträchtigung der TLR5-Bindung und haben außerdem eine nD1-Bindungsstelle, die mit denen von hochstimulierenden Flagellinen wie FliC identisch sind. Wir nannten diese *silent flagellins* und ihre Interaktion mit TLR5 *silent recognition*.

Um herauszufinden, wie *silent*-Flagelline die Bindung von TLR5 von der Aktivierung entkoppeln, haben wir die Interaktion zwischen TLR5 und *silent*-Flagellin mit der von TLR5 und FliC verglichen. Während beide Wildtyp-Flagelline den Rezeptor binden, unterscheiden sich ihre Bindungsmutanten (nD1-Mutanten) in ihrer Fähigkeit, TLR5 zu binden: Die *silent*-Flagellin-nD1-Mutanten können TLR5 nicht binden, im Gegensatz zur FliC-nD1-Mutante, die keinen Bindungsverlust aufweist [10]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *silent flagellins* TLR5 an einer einzigen Stelle binden, während FliC mehrere TLR5-Bindungsstellen besitzt. Wir entschlüsselten diese zusätzliche Bindungsstelle, ordneten sie der D0-Domäne von FliC zu (**Abb. 1A**) und testeten ihre Auswirkungen auf die Aktivierung von TLR5. Dazu ersetzten wir die *silent*-Flagellin-D0-Domäne (ohne Bindungsstelle) durch die FliC-D0-Domäne (mit Bindungsstelle) und überprüften die Fähigkeit dieses Hybrid-Flagellins, TLR5 zu aktivieren. Ausgestattet mit der zusätzlichen Bindungsstelle in der D0-Domäne, sind *silent flagellins* nun potentere TLR5-Agonisten [10]. Die D0-Bindungsstelle ist also ein allosterischer Aktivator.

Angesichts des Modells für die TLR5-Aktivierung stellten wir die Hypothese auf, dass

die allosterische Bindungsstelle FliC D0 für die Dimerisierung von TLR5 verantwortlich ist. Beim Testen dieser Annahme entdeckten wir jedoch, dass TLR5-Dimere auch ohne Liganden existieren. FliC bindet diese präformierten Dimere, aber *silent*-Flagelline zeigen keine Affinität für TLR5-Dimere [10]. Folgerichtig binden hybride Flagelline – *silent*-Flagelline, die das FliC D0 enthalten – TLR5-Dimere mit der nun zusätzlichen allosterischen Bindungsstelle. Das Vorhandensein von präformierten Dimeren zeigt, dass die Dimerisierung nicht induziert werden muss. Vielmehr reicht eine Konformationsänderung nach der Bindung von FliC an vorgeformte TLR5-Dimere aus, um TLR5 zu aktivieren. Insgesamt zeigt unsere Arbeit, dass *silent*-Flagelline von Kommensalen die Aktivierung von TLR5 vermeiden, indem sie nicht an vorgeformte TLR5-Dimere binden (**Abb. 2C**).

Die Existenz von stimulierenden, ausweichenden und *silent*-Flagellinen zeigt, dass Flagelline sehr unterschiedliche TLR5-Liganden sind. Ob diese verschiedenen Flagellin-Typen auch mit Unterschieden in der Motilität verbunden sind, muss noch ermittelt werden. Mehrere Bakterien, einschließlich kommensaler Mitglieder der Familie der Lachnospiraceae, codieren für alle drei Flagellin-Typen [10]. Offensichtlich sind die Bakterien in der Lage, TLR5 zu umgehen, ohne dabei ihre Beweglichkeit zu verlieren. Zukünftige Studien sind jedoch erforderlich, um zu verstehen, wie Bakterien diese Flagelline nutzen und ob TLR5 ihre Expression beeinflusst. ■

## Literatur

- [1] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A et al. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103
- [2] Maki-Yonekura S, Yonekura K, Namba K (2010) Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament. *Nat Struct Mol Biol* 17: 417–422
- [3] Botos I, Segal DM, Davies DR (2011) The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19: 447–459
- [4] Yoon S-I, Kurnasov O, Natarajan V et al. (2012) Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 335: 859–864
- [5] Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F et al. (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4: 1247–1253
- [6] Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL et al. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9247–9252
- [7] Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US et al. (2004) *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* 189: 1914–1920
- [8] Kreuzberger MAB, Ewing C, Poly F et al. (2020) Atomic structure of the *Campylobacter jejuni* flagellar filament reveals how  $\epsilon$  Proteobacteria escaped Toll-like receptor 5 surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 117: 16985–16991
- [9] Holzapfel M, Bonhomme D, Cagliero J et al. (2020) Escape of TLR5 Recognition by *Leptospira* spp.: A Rationale for Atypical Endoflagella. *Front Immunol* 11: 2007
- [10] Clasen SJ, Bell MEW, Borbón A et al. (2023) Silent recognition of flagellins from human gut commensal bacteria by Toll-like receptor 5. *Sci Immunol* 8: eabq7001
- [11] Louis P, Flint HJ (2009) Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett* 294: 1–8
- [12] Jumper J, Evans R, Pritzel A et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583–589

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ruth E. Ley  
 Abteilung für Mikrobiom-Wissenschaft  
 Max-Planck-Institut für Biologie  
 Max-Planck-Ring 5  
 D-72076 Tübingen  
[ruth.ley@tuebingen.mpg.de](mailto:ruth.ley@tuebingen.mpg.de)

## AUTORINNEN



### Sara J. Clasen

2006–2010 Studium der Biochemie und Molekularbiologie an der University of Arizona, USA, gefolgt von einer Promotion an der Johns Hopkins School of Medicine unter der Leitung von Dr. P. Espenshade. Seit 2018 PostDoc bei Dr. R. Ley am Department of Microbiome Science, Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen.



### Ruth E. Ley

2008–2016 Assistenz-/Assoziierungsprofessorin für Mikrobiologie und für Molekularbiologie und Genetik, Cornell University, Ithaca, NY, USA. Seit 2016 wissenschaftliches Mitglied der Max-Planck-Gesellschaft und Direktorin der Abteilung Mikrobiomforschung, MPI für Biologie, Tübingen, Deutschland. Seit 2022 geschäftsführende Direktorin des MPI für Biologie, Tübingen.