

Roles of toll-like receptors signaling in organ transplantation

LI Ting, CHEN Guodong, ZHANG Zheng et al.

Journal of Central South University 2011

Aufbau der Präsentation

- 1) Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden
- 2) TLRs in experimentellen Transplantations-Modellen
- 3) TLRs in klinischen Transplantationen
- 4) Abschluss



Christian
Doppler
Laboratory

for
Cardiac and Thoracic
Diagnosis & Regeneration



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

1) Toll-like Rezeptoren(TLR) und ihre Liganden

1.1) Geschichte der Toll-like Rezeptoren

- Sie wurden nach der Funktionellen und Strukturellen Ähnlichkeit zum „Toll-Protein“ benannt.
- Dieses wurde 1985 erstmals in der *Drosophila melanogaster* beschrieben.
- 1996, das Toll-Protein eine bedeutende Rolle in der Abwehr von Pilzinfektionen spielt, indem es die Synthese antimikrobieller Peptide initiiert.

Exkurs: Drosophila Melanogaster

- „Schwarzbäuchige“ Taufliege
- Familie der Taufliegen (Drosophilidae)
- einer der bestuntersuchten Organismen der Welt.
- „Fruchtfliege“ falsche Übersetzung aus dem Englischen „fruit fly“ (=„Falscher Freund“).



Quelle: Wikipedia

1.1) Geschichte der Toll-like Rezeptoren

- 1997 wurde schließlich das humane Homolog des Drosophila toll-protein beschrieben und Toll-like receptor benannt.
- In Säugetieren initiieren TLRs Zytokine und co-stimulatorische Peptide zur Aktivierung der adaptiven Immunabwehr.

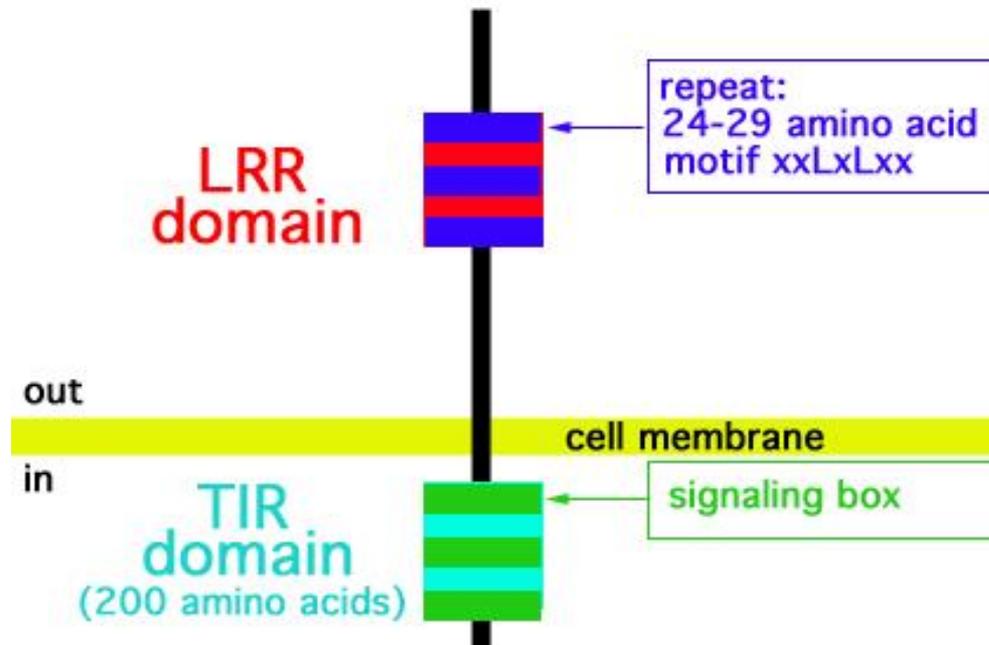
1.1) Geschichte der Toll-like Rezeptoren

- Heute sind 11 TLRs im Menschen und 13 TLRs in der Maus bekannt.
- Sie werden exprimiert auf:
 - dendritischen Zellen
 - B & T-Zellen
 - Monozyten/Makrophagen
 - NK-Zellen
 - Mastzellen
 - Astrozyten
 - Neuronen
 - einigen parenchymalen und endothelialen Zellen.

1.2) Struktur des Toll-like Rezeptors

- TLRs sind transmembran Rezeptoren, bestehend aus 3 Strukturregionen:
 - Eine **divergente extrazelluläre** Bindungsstelle für Liganden, mit Leucin reichen Repeats (LRR Domäne)
 - Eine kurze **Transmembrandomäne**
 - Ein hoch **homologer cytoplasmatischer** toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR Domäne).

1.2) Struktur des Toll-like Rezeptors



TIR: Toll/IL-1
LRR: leucine rich repeat

© jpherveg

<http://www.genemol.org>

1.3) Liganden des Toll-like Rezeptors

- Toll-like Rezeptoren, sind PRRs (pathogen recognition receptors).
- Jeder TLR hat eigene Spezifische PAMPs:
 - **TLR3:** Doppel-strängige RNA
 - **TLR4:** Lipopolysacharide gram negativer Bakterien
 - **TLR5:** Bakteriellies Flagellin
 - **TLR7:** Einzelstrang RNA (HIV-1, Influenza Virus, vesicular stomatitis virus)
 - **TLR8:** Einzelstrang RNA
 - **TLR9:** Bakterielle und virale CpG (Cytosin Phosphat Guanin) Motive
 - **TLR11:** Uropathogener E. coli

1.3) Liganden des Toll-like Rezeptors

- TLRs können Komplexe bilden um dadurch das Bindungsspektrum zu erweitern.
- TLR3 mit TLR1/TLR6
 - binden mehrere bakterielle Strukturen:
 - Peptidoglykane
 - Lipoproteine von gram positiven Bakterien
 - Mykoplasma.

1.3) Liganden des Toll-like Rezeptors

- TLRs binden auch endogene Liganden, sogenannte „Damage associated molecular patterns“ (DAMPs)
 - Freigesetzt bei Entzündung, zellulärem Stress und Zellschäden:
 - **Heat Shock Proteins (HSP)**
 - **High-mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1)**
 - **Fragments of hyaluronan (fHA)**

1.4) Die Toll-like Rezeptor Signalkasade

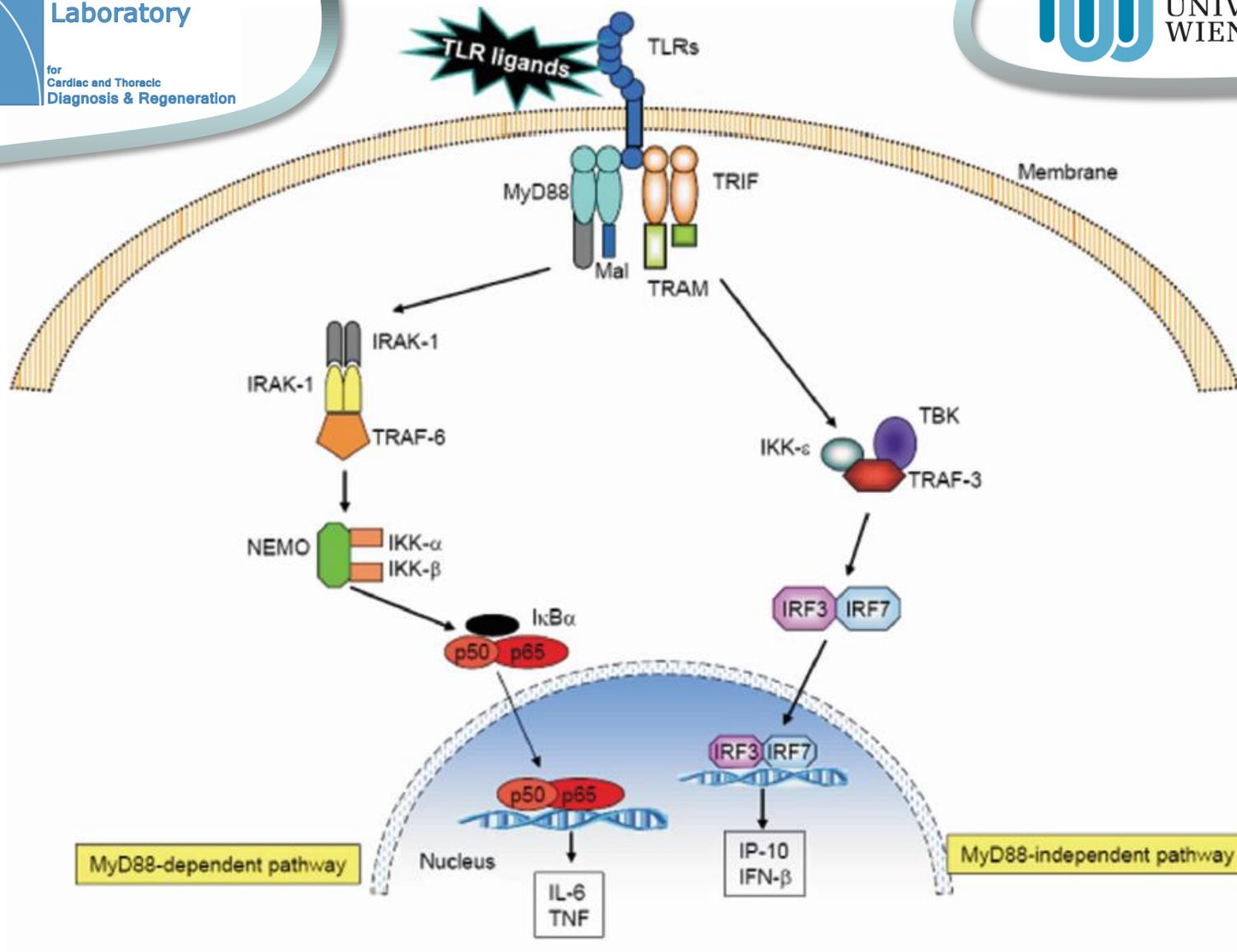
- TLRs rekrutieren 4 verschiedene Adapter Moleküle:
 - Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)
 - My88-adapter-like (Mal)
 - TIR-domain-containing adapter inducing interferon- β (TRIF)
 - TRIF-related adapter molecule (Tram)

1.4) Die Toll-like Rezeptor Signalkasade

- Die Adapter Moleküle aktivieren wiederum intrazelluläre Proteinkinasen
 - IL-1 receptor (IL-1 R)associated kinase (IRAK) 1
 - IRAK 4
 - IKK (Inhibitor of NF κ B kinase)
 - Tank binding kinase (TBK) 1

1.4) Die Toll-like Rezeptor Signalkasade

- Verschiedene TLRs aktivieren verschiedene Pathways.
 - **MyD88**
 - Häufigster Signalweg
 - Über IRAK und (Tumor Nekrose Faktor)TNF-receptor-associated factor 6 (TRAF6)
 - Inhibitor of NFκB kinase (IKK) Komplex
 - Translokation des (nuclear factor)NFκB
 - **TRIF** (My88independent pathway)
 - TLR 3 & 4
 - Über TBK (tank binding kinase), TRAF3 (TNR Receptor Assotiated Factor), IKK - Komplex
 - Interferon Regulatory transcription factor (IRF)3 & 7



Quelle: Roles of toll-like receptors signaling in organ transplantation; LI Ting, CHEN Guodong, ZHANG Zheng et al.; Journal of Central South University ;2011

1.4) Die Toll-like Rezeptor Signalkasade

- Toll-like Rezeptoren aktivieren NF κ B
- Produktion proinflammatorischer Zytokine
- Reifung von Dendritischen Zellen, Migration in die Lymphknoten
- Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem
- TLR 4 aktiviert beide Pathways

1.5) Die Regulation des TLR Pathways

- TLR induzierte Entzündung wird durch negatives Feedback von inhibitorischen Adapterproteinen reguliert:
 - **IRAK-M**
 - Verhindert die dissoziation von IRAK und IRAK4 von MyD88
 - **A20 Deubiquitinase**
 - Blockiert die IKK medierte NFκB Aktivierung
 - Unkontrollierte multi-organ Entzündung bei Defizienten Mäusen
 - **Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1**
 - Reguliert die TLRs/NFκB induzierte Immunreaktion

1.5) Die Regulation des TLR Pathways

- **Single immunoglobulin IL-1R-related molecule (SIGIRR)**
 - Bindet an TLRs ohne diese zu aktivieren
 - SIGIRR defiziente Mäuse zeigen eine verstärkte Chemokin Freisetzung nach IL-1 Injektion → verstärkte Immunreaktion
- **ST2L**
 - Membranständiges Mitglied der TIR Familie
 - Blockiert MyD88 und Mal
 - Negative Regulation von IL1-R und MyD88
 - Entscheidend für Endotoxintoleranzentwicklung

2) TLRs in experimentellen Transplantations- Modellen

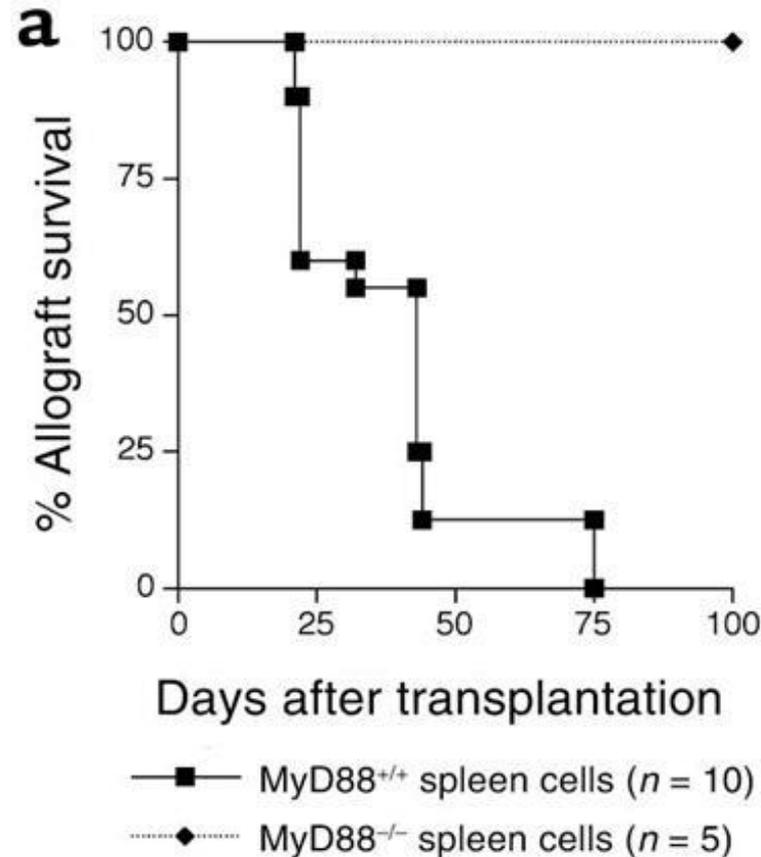
2.0) Allgemeines

- TLR2, TLR4, MyD88 & TRIF knock-out Mäuse
- Mikrobiellen Produkte sowie endogenen Liganden
 - nekrotisierenden Zellen
 - zugrunde gehender extrazellulärer Matrix
 - Durch das chirurgische Trauma
 - ischämischen/reperfusions Schaden
- Diese Produkte binden an den TLRs von:
 - parenchymalen Zellen des Transplantats
 - Monozyten des Empfängers
- Löst aus:
 - Reifung von Dendritischen Zellen
 - Antigen Präsentation
 - adaptive Immunantwort

2.1) MyD88 knock out Mäuse

- *Goldstein et al. „Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection“. J Clin Invest, 2003.*
- MyD88 knock out Mäuse nicht in der Lage HY-inkompatible Hauttransplantate abzustoßen.
- Infusion von Wild Typ APCs → Abstoßungsreaktion eingeleitet.
- Verminderte Zahl von Dendritischen Zellen in den umgebenden Lymphknoten

2.1) MyD88 knock out Mäuse

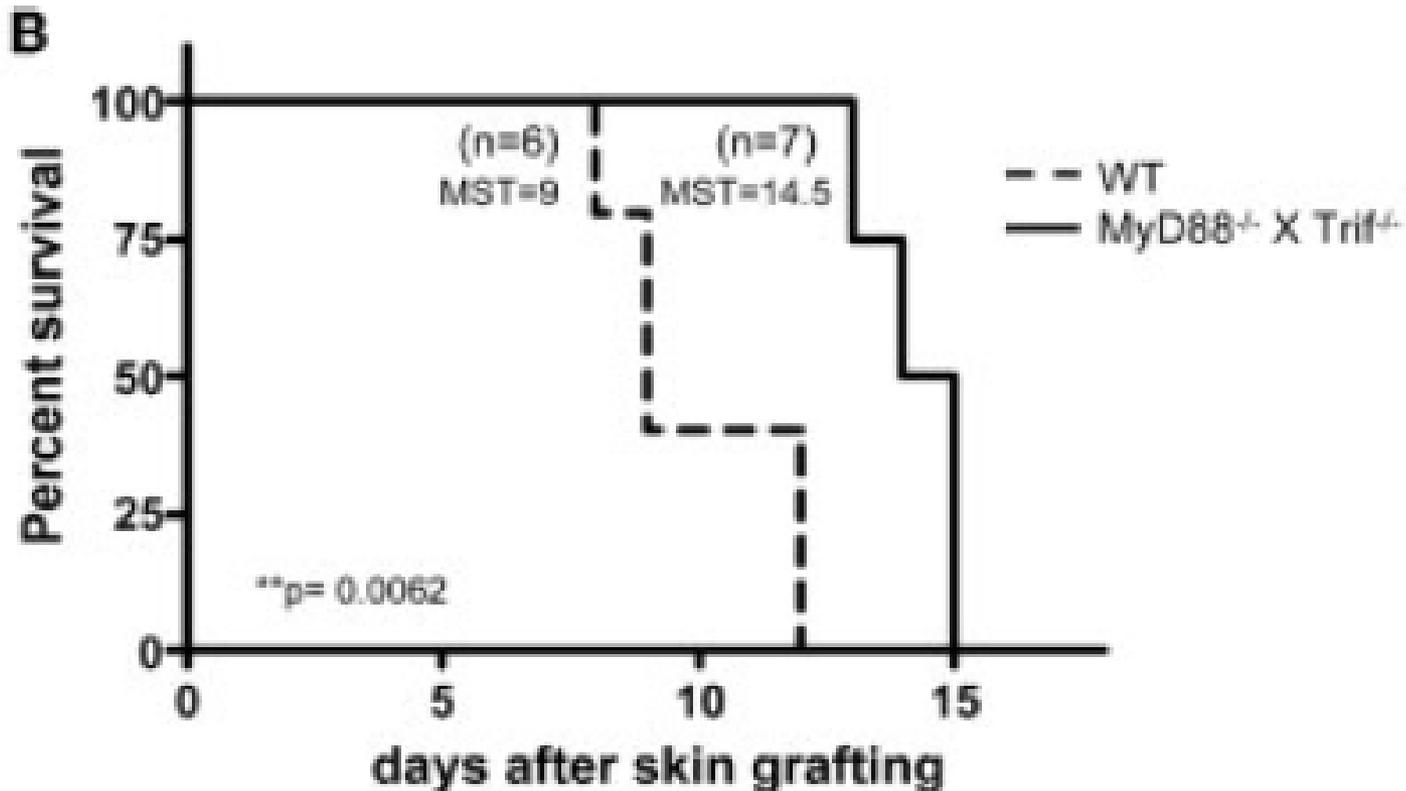


Quelle: Goldstein et al., "Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection". J Clin Invest, 2003.

2.2) MyD88 & TRIF double knock-out Mäuse

- *Me Kay D et al. „ Simultaneous deletion of MyD88 and Trif delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection“. European Journal of Immunology, 2006.*
- Gleichzeitiger knock out von MyD88 und TRIF im Spender.
- Führt zu verlängertem Hauttransplant überleben bei MHC inkompatiblen Mäusen.
- Verminderter DC Migration des Spenders zu den Lymphknoten
- Verzögerter Infiltration des Transplantates durch Empfänger T-Zellen.

2.2) MyD88 & TRIF double knock-out Mäuse



Quelle: Me Kay D et al. „ Simultaneous deletion of MyD88 and Trif delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection“. European Journal of Immunology, 2006.

2.3) Mäuse Nierentransplant Model

- TLR2 und TLR4Liganden, bei chronischen und akute Abstoßungsreaktionen hochreguliert.
 - glucose regulated protein (GRP)94
 - Fibrinogen
 - HSP-60, HSP-70
 - Biglycan (Bgn)
 - HMGB1
- In TLR2, TLR4, MyD88 und Trif defiziente Mäuse wurden Wild-type Nieren transplantiert
- Die Nierenfunktion war signifikant besser
- Weniger histopathologische Abstoßungszeichen (weniger T-Zellen, DCs & Makrophagen im Transplantat)

2.4) Kostimulations Blockade

- Die Blockade von TLR Kostimulatoren
 - Injektion von anti-CD154 mAb oder CTLA1g
- Verlängert das Transplantüberleben

2.4) Kostimulations Blockade

- Die Gabe von TLR Agonisten
 - TLR2:Pam3Cys
 - TLR3:polycytidylic acid
 - TLR4: LPS
 - TLR9:CpGbei gleichzeitiger Kostimulatoren Blockade
- Verlängerte Transplantüberlebenszeit in Haut und Herztransplantationen.

2.5) Stimulation eines einzelnen TLRs

- *Chen et al. „TLR signals promote IL-6/IL-17-dependent transplant rejection“.*
J Immunol, 2006
- Stimulation eines einzelnen TLRs (TLR9 durch CpG)
 - Verhindert anti-CD154-mediertes langzeit Herztransplantatüberleben bei MHC Inkompatibilität.
- MyD88 Mangel bei Spender und Empfänger, bei anti-CD154 behandelten Tieren
 - Erfolgreiches Hauttransplantatüberleben
- Aktivierung von TLR9 in hämatopoetischen Zellen
 - Expression von IFN- γ und IL-17 durch CD4+ T Zellen.



Christian
Doppler
Laboratory

for
Cardiac and Thoracic
Diagnosis & Regeneration



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

3) TLRs in klinischen Transplantationen

Tab. 1 Summary of selected studies on the significance of TLRs in human organ transplantations

Type of transplant	TLRs examined	Significance	References
Lung transplant	recipient TLR4Asp299Gly T14 Thr399Ile	Development of acute rejection	[20]
Cardiac tx	TLR4 mRNA	Endothelial dysfunction chronic rejection	[46]
	TLR2 , TLR4	TLR-2 correlated with biopsy-proven allograft rejection in both peripheral blood and local tissue	[47]
Liver tx	TLR 2 , 3	Acute rejection and post transplant cholangitis	[48]
	TLR2 , TLR4 in CD14	Acute rejection	[49]
	TLR2 Arg753Gln polymorphism	Post Tx CMV replication	[50]
	10 SNPs: TLR1 (S6021) , TLR2 (R753Q) , TLR3 (L412F) , TLR4 (D299G and T399I) , TLR5 (R392X) , TLR6 (S249P) , TLR7 (Q11L) , TLR9 (-1237T/C and -1486C/T) genes	TLR3 L412F in acute rejection in liver transplant patients for HCV-related cirrhosis	[51]
	TLR2 and 4 expression on CD14 ⁺ cells	TLR4 may be responsible for the early activation of alloimmune T-cells, favoring allograft rejection	[52]
Kidney Tx	TLR4 polymorphism TLR4Asp299Gly	Atherosclerotic complications , acute rejection , infection	[53]
	TLR4 polymorphism, TLR4 (299)G allele	Long term graft survival	[54]
	Donor TLR4 functional polymorphisms (Asp299Gly and Thr399Ile) expression	Acute rejection	[55]
	Asp299Gly, or Thr399Ile	No significance	[56]
	TLR4 expression on CD14	Acute rejection	[57]
	MyD88 , TLR4 mRNA and protein expression on PBMCs and graft	Long survival , tolerance, chronic rejection	[58]
	TLR4 , TLR2 , TLR9	Chronic rejection	[59]
	TLR4 , TLR3 polymorphism	Acute rejection	[60]
	Microarray including 128 gene in TLR pathway activation	Acute and chronic rejection	[61]
	TLR1/2/4/7/8	Acute rejection	[62]
11 SNPs (single nucleotide polymorphisms) in TLR2 , TLR3 , TLR4 , TLR5 , TLR9	TLR3 TT/CT allele is associated with acute rejection and TLR9 in cardiac complications	[63]	

3.0) Approaches

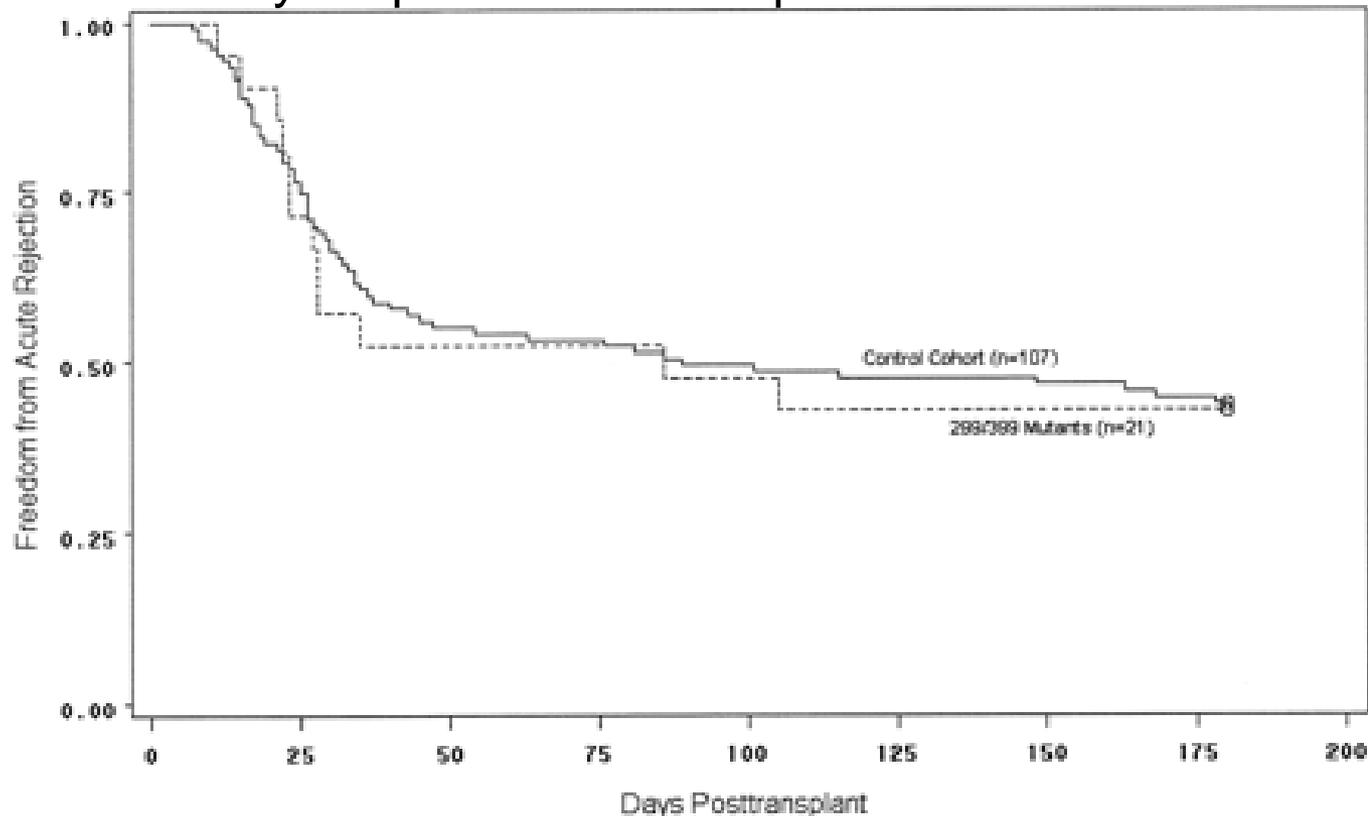
- DNS Screening
 - Identifizierung von Polymorphismen der TLR expression
 - auf peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), von Spender und Empfänger
- Flow Zytometrie / PCR (quantitative polymerase Kettenreaktion)
 - Korrelation: Regulation von PBMCs mit akuter Transplantabstoßung
- Antwort von isolierten Empfänger PBMCs auf TLR-Liganden Stimulation.

3.1) TLR4 in Lungentransplantationen

- *Palmer S et al. „The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation“. Am J Respir Crit Care Med, 2003.*
- **Asp299GGly** und **Thr399Ile**
 - Beschriebene TLR4 Polymorphismen, mit verminderter Aktivität des Rezeptors
- Diese Polymorphismen bei **Empfängern**
 - Signifikant erhöhtes 6-Monat-Transplantüberleben
- TLR4 in Empfänger Leukozyten
 - entscheidende Rolle bei der akuten Abstoßungsreaktion spielen
 - nicht aber das TLR4 im Bronchialepithel des Spenders

3.1) TLR4 in Lungentransplantationen

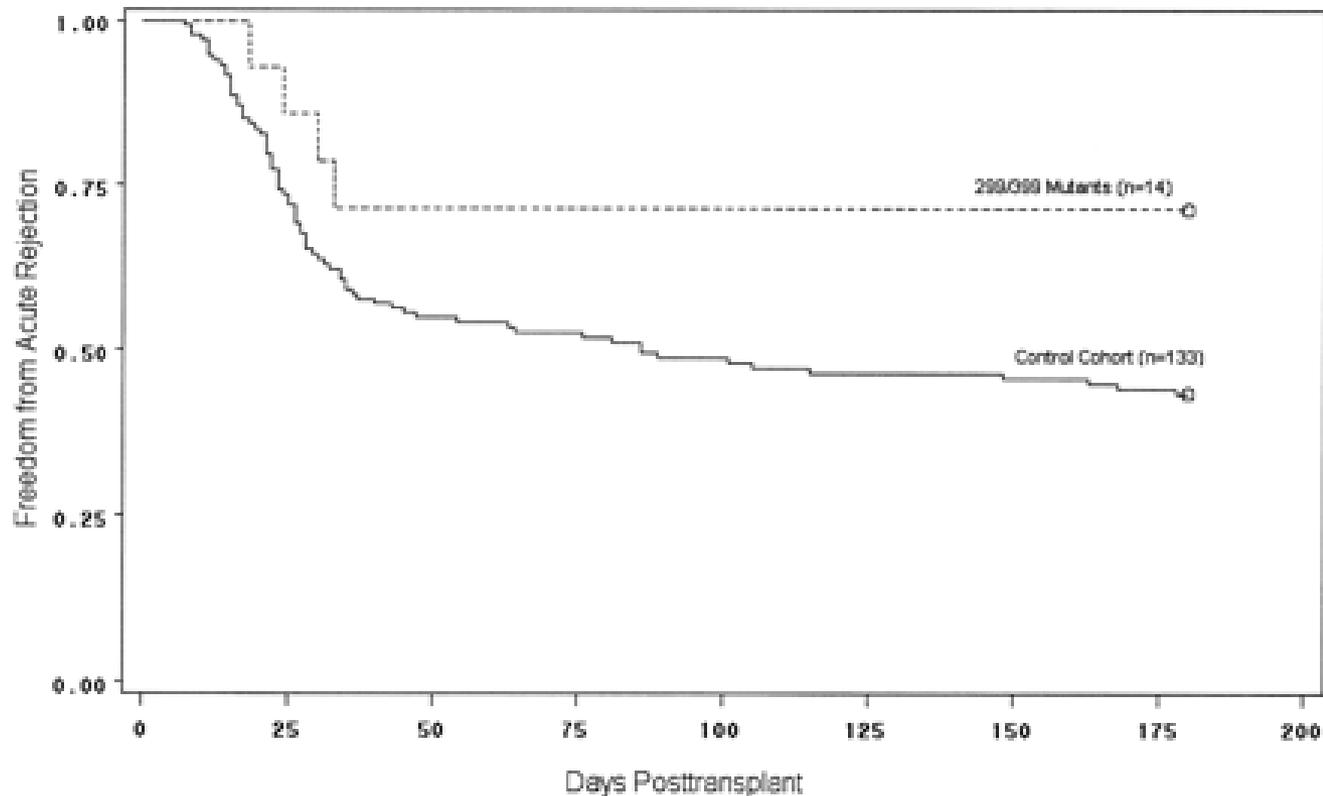
Einfluss der Polymorphismus beim Spender



Quelle: Palmer S et al. „The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation“. Am J Respir Crit Care Med, 2003.

3.1) TLR4 in Lungentransplantationen

Einfluss der Polymorphismus beim Empfänger



Quelle: Palmer S et al. „The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation“. Am J Respir Crit Care Med, 2003.

3.2) TLR4 in Nierentransplantationen

- *Ducloux D et al. „Relevance of toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation“. Kidney Int, 2005.*
- Kein Einfluss der TLR4 Allele des Empfängers
- Empfänger von **Asp299Gly** oder **Thr399Ile** heterozygoten Transplantaten
 - Signifikant reduzierte Nierentransplantatabstoßungen.
- Polymorphismen **D299G** und **T399I**
 - Verminderte akuten Abstoßung
 - Vermindertes Auftreten artherosklerotischer Ereignisse
- Angeborene Immunität des Spenders, nicht des Empfängers, bei der Nierentransplantation ausschlaggebend.

3.2) TLR4 in Nierentransplantationen

Table 4. Post-transplant outcomes in patients with the wild-type TLR4 genotype and those with either Asp299Gly or Thr399Ile or both

	Wild-type genotype carriers	TLR4 polymorphism carriers	<i>P</i>
Acute rejection	26.1%	7.4%	0.02
Bacterial infections	21.3%	51.9%	0.002
CMV disease	23.2%	44.4%	0.02
Opportunistic infections	6.2%	22.2%	0.008
All infections	36.4%	85.2%	
Atherosclerotic events	24.6%	7.4%	0.025
Return to dialysis	10.1%	11.1%	0.45
Death	5.7%	0	0.11

3.3) TLR4 und HMGB1

- Krüger B et al. „A comprehensive genotype-phenotype interaction of different Toll-like receptor variations in a renal transplant cohort“. Clin Sci, 2010.
- Hypothese:
 - Transplantate von verstorbenen Spendern rufen verstärkte Reaktionen beim Empfänger hervor
 - Endogene oder exogene Liganden aktivieren TLR4 in den Nieren Verstorbener
- HMGB1 im Nierentubulus Verstorbener hochreguliert (nicht bei Lebenden).
- Der Verlust der TLR4 Funktion hatte einen Effekt auf Transplantate von Verstorbenen, nicht jedoch von lebenden Spendern.
- HMGB1 ist im ischämischen Status erhöht und steuert proinflammatorische Gene über TLR4 im Nierengewebe.

3.4) Lebertransplantationen und TLR3

- *Citores et al. „Toll-like receptor3 L412F polymorphism may protect against acute graft rejection in adult patients undergoing liver transplantation for hepatitis C-related cirrhosis“. Transplantation Proceedings, 2011.*
- Untersuchung von 100 lebertransplantations Patienten auf 10 verschiedene Polymorphismen
- Der **TLR3 L412F Polymorphismus** wurde mit einer verminderten akuten Abstoßungsrate in Verbindung gebracht.

3.5) TLR2 Expressionsmuster

- *Mc Daniel D O et al. „Cardiac allograft rejection correlates with increased expressions of toll-like receptors 2 and 4 and allograft inflammatory factor1“. Transplant Proc, 2010.*
- TLR2 Expression im peripheren Blut sowie im lokalen Gewebe
 - Korreliert mit Biopsie bestätigter Transplantabstoßung.
- TLR2 als diagnostischer Biomarker für frühe Transplantabstoßung

4) Abschluss

4.1) Konklusio

- TLRs können durch endogene Liganden (HSPs, fHA und HMGB1), aktiviert werden. Die in der frühen Phase der Transplantation, aufgrund von Ischämie und Reperfusionsschäden freigesetzt werden. Durch **Blockade der TLRs** könnten diese Komplikationen minimiert und das Outcome von Transplantationen verbessert werden.
- Durch **Screening von TLR Polymorphismen**, könnte das Risiko einer Abstoßung eingeschätzt werden und die immunsuppressive Therapie individuell optimiert werden.
- TLR Expressionsmuster in peripherem Blut sowie am Transplantgewebe als **Biomarker** zur Früherkennung von Abstoßungsreaktionen.
- Die pharmazeutische **Modulation von TLR-Signalwegen**, könnte Erfolge in der Behandlung von Entzündungen und Transplantabstoßungen bringen.

4.2) Quellen

- Li T et al. „*Roles of toll-like receptors signaling in organ transplantation*“. Journal of Central South University, 2011
- <http://www.wikipedia.de>
- <http://www.genemol.org>
- Goldstein D R et al. „*Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection*“. J Clin Invest, 2003
- Me Kay D et al. „*Simultaneous deletion of MyD88 and Trif delays major histocompatibility and minor antigen mismatch allograft rejection*“. European Journal of Immunology, 2006.
- Palmer S et al. „*The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation*“. Am J Respir Crit Care Med, 2003.
- Ducloux D et al. „*Relevance of toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation*“. Kidney Int, 2005.

Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!