

Summary

NLR proteins specifically recognize effectors from host-adapted pathogens and activate robust disease resistance responses generally coupled with hypersensitive response cell death, which constitutes the major barrier for defense. Plant TNLs converge on the EDS1-family of lipase-like signaling proteins for all immune outputs. Arabidopsis EDS1 heterodimers with PAD4 and the importance of EDS1-PAD4 heterodimers for protecting and transcriptionally boosting basal defenses and ETI, including SA immunity have been well studied. EDS1 uses the same surface to interact with a second partner, SAG101, but there is little known about the function of EDS1-SAG101 heterodimer.

CC_R-NLRs (NRG1 and ADR1) have been identified as helper NLR signaling downstream of plant sensor NLRs. Tobacco NRG1 are required for TNL Roq1 mediated cell death. Arabidopsis ADR1-family proteins act redundantly in signaling downstream of CNL and TNL. Therefore, helper NLR are a key link between sensor NLR activation and immunity execution. However, the molecular functions of NRG1 in Arabidopsis during ETI in Arabidopsis and whether NRG1 functionally overlaps with ADR1 proteins is not clear. A strongly co-occurrence signature of SAG101 and NRG1 across plant species and recent evidence of a coevolved *AtEDS1-AtSAG101-AtNRG1* cell death module point to functional crosstalk between EDS1-family and helper NLR in immunity.

In this thesis, the unique EDS1-SAG101 heterodimer signaling function in diverse Arabidopsis pathogen triggered immune responses (including resistance and cell death) are analyzed in single and high-order *EDS1*-family proteins mutants. Also, the function of NRG1 and comparison with its close homology ADR1 are characterized in single and combined *NRG1* and *ADR1* mutants. I show that *NRG1* and *ADR1* can function independently or cooperatively, depending on sensor NLRs. I further demonstrate that *SAG101* phenocopies *NRG1* and *PAD4* phenocopies *ADR1*, respectively, in NLR immunity. In TNL RRS1S/RPS4 mediated immune responses, *NRG1/SAG101* are required for cell death whereas *NRG1/SAG101* and *ADR1/PAD4* function together for resistance. In TNL RPP4 and CNL RPS2 mediated ETI, only *ADR1/PAD4* but not *NRG1/SAG101* are required for resistance and cell death. In basal immune responses to virulent pathogens, only *ADR1/PAD4* are indispensable and no detectable contribution from *NRG1/SAG101*.

I investigated whether EDS1-family and helper NLR co-function by forming complex but did not detect specific *AtEDS1-AtNRG1* interaction in *N.benthamiana*. More robust and targeted approaches are discussed to address this question.

To remove possible confounding effects of SA in Arabidopsis immunity, the functions of helper NLR and EDS1-family are further investigated when the SA main biosynthetic enzyme gene *ICS1* is mutated. I show that *ADR1/PAD4* stimulated Arabidopsis TNL RRS1S/RPS4 triggered cell death when *NRG1/SAG101* cell death branch and SA were dampened, indicating that SA suppress RRS1S/RPS4 triggered cell death. By contrast, the *ADR1/PAD4* module compensates for loss of SA and *NRG1/SAG101* in resistance. In CNL RPS2 mediated immune responses, *ADR1/PAD4* and SA sectors are essential and there is no redundancy between *NRG1/SAG101* and SA. Therefore, there are different usage of SA for TNL RRS1S/RPS4 and CNL RPS2 mediated resistance

Mutation in NB domain (MHD motif) of sensor NLRs leading to autoactivation. *AtNRG1* MHD mutation resulted autoimmunity is dependent on the P-loop, which reflect that helper NLR can be activated like canonical NLRs. *AtNRG1* P-loop is required for *AtEDS1-AtSAG101-AtNRG1* mediated cell death in *Nb-epss*. The open question is whether *NRG1* can function in a P-loop independent manner.

Results presented in this work provide new insights to the genetic architecture and functions of helper NLR in Arabidopsis immunity, and their relationship with EDS1-family proteins downstream of TNL activation. The distinct functions of *NRG1/SAG101* and *ADR1/PAD4* supports two distinctive signaling arms (cell death and resistance) in TNL immunity. The biochemical nature of EDS1-family and helper NLR co-functions is important to resolve in future work.

Zusammenfassung

NLR-Proteine erkennen spezifisch Effektoren von an den Wirt angepassten Pathogenen und aktivieren Immunantworten, die oft mit einer hypersensitiven Reaktion und Zelltod einhergehen. Dies stellt einen wichtigen Teil der Immunabwehr dar. Alle Immunparameter pflanzlicher TNLs laufen in den Lipase-ähnlichen Proteinen der EDS1-Familie zusammen. EDS1 bildet in Arabidopsis einen Heterodimer mit PAD4. Diese Bindung und die damit einhergehende Hochregulierung basaler Abwehrmechanismen und ETI wurden bereits ausführlich erforscht. Mit der gleichen Oberfläche interagiert EDS1 auch mit einem weiteren Partner, SAG101. Im Gegensatz zum EDS1-PAD4 Dimer, ist die Funktion von EDS1-SAG101 weitestgehend unerforscht.

CC_R-NLRs (NRG1 und ADR1) wurden als sogenannte Helfer-NLRs identifiziert, und sind im Signalweg den Sensor-NLR Proteinen nachgeschaltet. NRG1 aus Tabak ist für Roq1-vermittelten Zelltod notwendig. Arabidopsis-Proteine der ADR1-Familie agieren redundant in dem der CNL und TNL-Proteinen nachstehenden Signalweg. Deshalb nehmen Helfer-NLRs eine Schlüsselrolle in der Verbindung von aktivierten Sensor-NLRs und der Umsetzung der Immunantwort ein. Dennoch sind die molekulare Funktion von NRG1 während ETI in Arabidopsis, und die mögliche funktionale Überlappung von NRG1 mit ADR1-Proteinen im Signalweg, noch ungeklärt. Das gemeinsame Vorhandensein von SAG101 und NRG1 in vielen Pflanzenarten, sowie aktuelle Hinweise auf ein koevolutionär entwickeltes AtEDS1-AtSAG101-AtNRG1 Zelltodmodul, deuten auf funktionellen Austausch zwischen der EDS1-Familie und Helfer-NLRs hin.

In dieser Dissertation wurden die Signalfunktionen des EDS1-SAG101 Heterodimers in vielfältigen Immunreaktionen auf Krankheitserreger in Arabidopsis (darunter Resistenz und Zelltod) in einfachen und höheren Mutanten der *EDS1*-Familie untersucht. Außerdem wurde die Funktion von NRG1 im Vergleich zu dem nahe verwandten ADR1 in einfachen und kombinierten *NRG1* und *ADR1* Mutanten genauer betrachtet. Ich zeige, dass NRG1 und ADR1, abhängig von den jeweiligen Sensor-NLRs, entweder eigenständig oder zusammen agieren. Darüber hinaus präsentiere ich, dass jeweils *SAG101 NRG1* und *PAD4 ADR1* in der NLR Immunantwort phänokopieren. In der durch die TNLs RRS1/RPS4 aktivierten Immunantwort sind *NRG1/SAG101* für Zelltod erforderlich, wohingegen *NRG1/SAG101* und *ADR1/PAD4* zusammen für Resistenz verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu, sind in der durch den TNL

RPP4 und den CNL RPS2 vermittelten Immunantwort nur *ADR1/PAD4* und nicht *NRG1/SAG101* erforderlich. In der basalen Immunantwort gegen virulente Krankheitserreger sind *ADR1/PAD4* unverzichtbar, wobei eine Beteiligung von *NRG1/SAG101* nicht nachgewiesen werden kann. Zudem habe ich untersucht ob Proteine der EDS1-Familie und Helfer-NLRs in einem Komplex funktionieren, konnte aber keine spezifische AtEDS1-AtNRG1 Interaktion nachweisen. Um dieser Hypothese in Zukunft nachzugehen, werden robustere und zielgerichtete Ansätze diskutiert.

Um mögliche Störeinflüsse von SA auf die Immunantwort in Arabidopsis auszuschließen, wurden die Funktionen von Helfer-NLRs und Proteinen der EDS1-Familie weiterführend in Mutanten des hauptverantwortlichen SA Biosyntheseenzym *ICS1* untersucht. Ich zeige hier, dass *ADR1/PAD4* den durch die Arabidopsis TNLs RRS1S/RPS4 ausgelösten Zelltod fördern, wenn der *NRG1/SAG101* Zelltodsignalweg und SA gehemmt sind, was darauf hinweist, dass SA den von RRS1S/RPS4 induzierten Zelltod unterdrückt. Im Gegensatz dazu kompensiert das *ADR1/PAD4* Signalmodul für den Verlust von SA und *NRG1/SAG101* in der Resistenzantwort. In der durch den CNL RPS2 ausgelösten Immunantwort sind *ADR1/PAD4* und SA essentiell und es besteht keine Redundanz zwischen *NRG1/SAG101* und SA. Demzufolge wird SA in TNL RRS1S/RPS4 und CNL RPS2 vermittelter Resistenz unterschiedlich eingesetzt.

Mutationen in der NB-Domäne (MHD-Motif) von Sensor-NLRs führen zur Autoaktivierung der Rezeptoren. Die Autoaktivierung von AtNRG1 durch MHD Mutationen ist anhängig vom P-Loop, was darauf hindeutet, dass Helfer-NLRs auf eine ähnliche Weise aktiviert werden können wie herkömmliche NLRs. Der AtNRG1 P-Loop wird in *Nb-eps* zur Ausführung des durch AtEDS1-AtSAG101-AtNRG1 vermittelten Zelltod benötigt. Eine offene Frage ist, ob NRG1 auch P-Loop unabhängig funktionsfähig ist.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bieten neue Einblicke in die genetische Architektur und Funktionen von Helfer-NLRs im Kontext des Immunsystems von Arabidopsis und deren Zusammenhang mit nachgeschalteten Proteinen der EDS1-Familie. Die eigenständigen Funktionen von NRG1/SAG101 und ADR1/PAD4 befürworten das Vorhandensein zweier Abzweigungen (Zelltod und Resistenz) in der TNL Immunantwort. Die nächste Herausforderung wird es sein, die biochemischen Eigenschaften der EDS1-Proteinfamilie und mit ihr assoziierten Helfer-NLRs weiterführend zu erforschen.