

Biological function and subcellular dynamics of plant MLKLs conferring TNL-triggered immunity

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Qiaochu Shen

aus Heihe, China

Köln, February 2024

Die vorliegende Arbeit wurde am Universität zu Köln und Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln, Arbeitsgruppe Dr. Takaki Maekawa durchgeführt.

The current study was conducted at University of Cologne and Max Planck Institute for Plant Breeding Research under the supervision of Dr. Takaki Maekawa.



Berichterstatter:	Prof. Dr. Gunther Döhlemann
	Prof. Dr. Stanislav Kopriva
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Ana J. Garcia-Saéz
Beisitzende/r:	Dr. Takaki Maekawa

Abstract

Plant MLKLs are newly identified proteins that share structural similarities with the vertebrate necroptosis mediator MLKL (mixed lineage kinase domain-like). They consist of an N-terminal HeLo domain followed by a brace region and a pseudokinase domain and contribute to signaling downstream of TNL (Toll-interleukin 1-receptor domain NLR)-mediated immunity in *Arabidopsis thaliana*. Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) analysis of wild-type *AtMLKLs* has revealed a tetrameric configuration, with the N-terminal HeLo domains fully encapsulated. However, the mechanisms underlying the contribution of plant MLKLs to TNL-triggered immunity remain to be elucidated. Here, I show that GFP-tagged *Arabidopsis* MLKL1 (*AtMLKL1*) clusters into puncta at the plasma membrane upon TNL activation. Furthermore, I find that phosphatidylserine and the membrane trafficking pathway are required for the clustering of *AtMLKL1* localization to plasma membrane. In addition, I discover that *AtMLKL1* puncta and its role in TNL-triggered immunity are dependent on the EDS1 family proteins, key transducers of TNL signaling. Moreover, my study indicates that the N-terminal HeLo domain of *AtMLKL1*, indispensable for the punctate formation, mediates Ca^{2+} influx and is responsible for the disease resistance activity. Using a newly established noninvasive microscopy method that enables long-term monitoring of changes in cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) concentration in leaves, my results show that the *Arabidopsis mlkl* null mutant does not exhibit $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation at a later stage of AvrRps4-dependent TNL-type immunity, but has a similar pattern of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation during AvrRpm1-dependent CNL-type immunity, compared to that of wild-type *Arabidopsis*. Taken together, my study demonstrates that *AtMLKL1* undergoes HeLo domain-mediated reorganization, confers immunity in an EDS1-dependent manner and mediates $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ influx during TNL-triggered immunity. My findings reveal a novel immune signaling function of plant MLKLs during TNL immune responses.

Zusammenfassung

Pflanzliche MLKLs sind neu identifizierte Proteine, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Wirbeltier-Nekroptose-Mediator MLKL (mixed lineage kinase domain-like) aufweisen. Sie bestehen aus einer N-terminalen HeLo-Domäne, gefolgt von einer „brace“-region und einer Pseudokinase-Domäne und tragen in *Arabidopsis thaliana* zur Signalübertragung nach der TNL (Toll-Interleukin 1-Rezeptordomäne NLR)-vermittelten Immunität bei. Kryo-Elektronenmikroskopische (Kryo-EM) Analysen von Wildtyp-*AtMLKLs* haben eine tetramerische Konfiguration ergeben, wobei die N-terminalen HeLo-Domänen vollständig eingekapselt sind. Die Mechanismen, die dem Beitrag der pflanzlichen MLKLs zur TNL-ausgelösten Immunität zugrunde liegen, müssen jedoch noch aufgeklärt werden. Hier zeige ich, dass sich GFP-markiertes *Arabidopsis MLKL1 (AtMLKL1)* bei TNL-Aktivierung zu Pünktchen an der Plasmamembran zusammenschließt. Zudem stelle ich fest, dass Phosphatidylserin und der Membrantransportweg für die Clusterbildung der *AtMLKL1*-Lokalisierung an der Plasmamembran erforderlich sind. Darüber hinaus entdecke ich, dass die *AtMLKL1*-Punktierung und ihre Rolle in der TNL-ausgelösten Immunität von den Proteinen der EDS1-Familie abhängt, welche zu den wichtigsten Transduktoren der TNL-Signalübertragung zählen. Außerdem lässt meine Studie darauf schließen, dass die N-terminale HeLo-Domäne von *AtMLKL1*, die für die Punktbildung unerlässlich ist, zytosolischen Ca^{2+} -Einstrom vermittelt und für die Krankheitsresistenz verantwortlich ist. Unter Verwendung einer neu etablierten nicht-invasiven Mikroskopie-Methode, die eine langfristige Überwachung von Veränderungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) in Blättern ermöglicht, zeigen meine Ergebnisse, dass die *Arabidopsis mlkl*-Null-Mutante keine $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Erhöhung in einem späteren Stadium der AvrRps4-abhängigen TNL-artigen Immunität zeigt, aber im Vergleich mit dem *Arabidopsis* Wildtyp, ein ähnliches Muster der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Erhöhung während der AvrRpm1-abhängigen CNL-artigen Immunität aufweist. Insgesamt zeigt meine Studie, dass *AtMLKL1* eine durch die HeLo-Domäne vermittelte Reorganisation erfährt, Immunität in einer EDS1-abhängigen Weise gewährt und den $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Einstrom während der TNL-ausgelösten Immunität vermittelt. Meine Ergebnisse offenbaren eine neuartige Immun-Signalfunktion von pflanzlichen MLKLs während TNL-ausgelösten Immunantworten.