

Abstract

Bioinformatical analyses revealed an evolutionary relationship between HeLo domains from the animal, plant and fungal kingdom, which all possess a similar four-helical bundle fold. In animals, the HeLo domain is part of the necroptosis executioner protein MLKL and is responsible for cell death initiation. Furthermore, cell death execution via HeLo domain is accompanied by a rapid increase of intracellular calcium level. The cell death mediation in fungal heterokaryon incompatibility as well as in plant hypersensitive response also rely on the involvement of an N-terminal HeLo domain. A second domain type shared between immunity and cell death regulators of different kingdoms is the TIR domain. In mammals, TIR domains usually mediate protein interactions and have no catalytic activity, with SARM1 being the only known exception. By contrast, the TIR domains of plant proteins are usually catalytically active and use NAD^+ as a substrate. The NAD^+ hydrolysing activity of human SARM1 leads to NAD^+ depletion that in turn causes axonal cell death. The plant TNL resistosome, however, converts NAD^+ into smaller secondary messenger molecules, which either mediate EDS1-dependent resistance or induces cell death. The mediation of resistance and the execution of cell death both rely on downstream factors such as the HeLo domain-containing RNL proteins ADR1 and NRG1.

This study focusses on the similarities and differences in the execution mechanism of HeLo domains from human MLKL, fungal HET-S/s and various plant proteins. The use of a chemically-induced activation system allows the release of isolated HeLo domains, and uncouples their activation from upstream signalling. It could be demonstrated that the liberation of the isolated human HeLo domain of MLKL mediates rapid cell death, accompanied by an increase of calcium in the early stages of cell death induction. Furthermore, it was shown that MLKL-mediated cytotoxicity is independent of calcium flux, while the activation of plant and fungal HeLo domains leads to calcium influx without major cytotoxicity in human cells. Only the HeLo domain from *AtMCA1* was able to trigger cell death and calcium flux in human cells. While the isolated HeLo domain of *AtMCA2* caused a large increase of cytosolic calcium in absence of cytotoxicity, the deletion of the first 21 amino acids made the MCA2 HeLo domain cytotoxic without causing major calcium influx. The results suggest that all investigated HeLo domains can form calcium channels. During bioinformatical analysis, a family of human NLR-like proteins were found to contain an effector domain that structurally resembles the TIR domain. This novel domain type was termed TeTIR, based on the first identification in the protein TEP1. The solved crystal structure of the TEP1 TeTIR domain revealed a TIR-like fold that resembles SARM1 and *AtRPP1*. Furthermore, it could be shown that the TEP1 TeTIR domain possesses an NAD^+ hydrolysing activity that depends on a catalytic glutamic acid. The finding that the TeTIR domains of both TEP1 and NWD2 can mediate cell death and have the ability to oligomerise suggests that the TeTIR domains may represent a mammalian version of the TNPs from plants.

Zusammenfassung

Bioinformatische Untersuchungen haben eine strukturelle Verwandtschaft zwischen HeLo Domänen von Tieren, Pflanzen und Pilzen gezeigt. Bei Tieren ist die HeLo Domäne Teil des Zelltodproteins MLKL und für die Auslösung von Nekroptose verantwortlich und induziert zeitgleich einen schnellen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Zelltod bei Pilzen und Pflanzen beruht ebenfalls auf der Beteiligung einer N-terminalen HeLo-Domäne. Die TIR Domänen sind ein weiterer Domäentyp, die als Immune- und Zelltodregulator in verschiedenen Reichen zu finden sind. Während TIR Domänen beim Menschen mit Ausnahme von SARM1 keine katalytische Aktivität besitzen, haben pflanzliche TIR Domänen eine enzymatische Aktivität und verwenden NAD^+ als Substrat. Die hydrolytische Aktivität von SARM1 führt zu einer NAD^+ -Reduktion, die ausschlaggebend für axonalen Zelltod ist. Pflanzliche TIR Domänen hydrolysieren NAD^+ zu sekundären Botenmolekülen, die entweder eine EDS1-abhängige Pathogenresistenz vermitteln oder Zelltod auslösen. Diese Vermittlung der Resistenz und die Durchführung des Zelltods beruht jeweils auf den HeLo Domänen-enthaltenen Proteinen ADR1 und NRG1.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Ausführungsmechanismus der HeLo Domänen aus menschlichem MLKL, Pilz HET-S/s und Pflanzenproteinen. Durch die Verwendung eines chemischen Aktivierungssystems konnten isolierte HeLo Domänen ohne weitere Aktivierung freigesetzt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die HeLo Domäne des humanen MLKL einen schnellen Zelltod vermittelt, der mit einem Anstieg des Kalziums in den frühen Stadien der Zelltodinduktion einhergeht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der durch die HeLo Domäne von MLKL vermittelte Zelltod unabhängig vom Kalziumfluss ist, während die Freisetzung der HeLo Domäne aus Pflanzen und Pilzen zu einem Kalziumfluss führt, jedoch ohne Zelltod auszulösen. Die HeLo Domäne von MCA2 führte zu einem enormen Anstieg des Kalziumspiegels, ohne dabei die Zellen zu töten. Die Entfernung der ersten 21 Aminosäuren änderte die Funktion von MCA2 zu einem zytotoxischen Protein, ohne das intrazelluläre Kalzium zu erhöhen. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass alle HeLo Domänen die Fähigkeit besitzen Kalzium zu induzieren.

Bei der bioinformatischen Analyse wurde eine Gruppe menschlicher NLR-ähnlicher Proteine mit einer Effektor-domäne identifiziert, die strukturell der TIR Domäne von menschlichem SARM1 und *Arabidopsis* RPP1 ähnelt. Der neuartige Domäentyp wurde als TeTIR bezeichnet, basierend auf der ersten Identifizierung in dem Protein TEP1. Die gelöste Kristallstruktur der TEP1 TeTIR Domäne zeigte nicht nur eine TIR ähnliche Faltung, sondern auch eine NAD^+ hydrolytische Aktivität. Das Ergebnis, dass die TeTIR Domänen von TEP1 sowie von NWD2 den Zelltod vermitteln können und die Fähigkeit zur Oligomerisierung besitzen, legt nahe, dass die TeTIR Domänen eine Säugetierversion der TNP Proteine von Pflanzen darstellen könnten.