

## TIR-catalyzed Small Molecules: Structure and Function in Plant Immunity

Seong-Hyeon Bae<sup>1,2</sup>, Sang-Hyun Park<sup>1,2</sup>, Ye-Rim Cha<sup>1,2</sup>, Dawon Jeon<sup>1,2</sup> and Gah-Hyun Lim<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea<sup>2</sup>Institute of Systems Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received August 20, 2024 / Revised September 2, 2024 / Accepted September 12, 2024

Plants recognize pathogens through intracellular receptors that trigger defense signaling. Nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR) proteins within a cell specifically recognize pathogenic molecules (effectors), leading to signal transduction that ultimately triggers the cell death pathway, thereby inducing effector-triggered immunity in plants. NLR proteins are broadly categorized into two types based on their N-terminal domains: coiled-coil domain NLRs (CNLs) and toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain NLRs (TNLs) are defined by their unique N-terminal domains. The TIR domain, which is responsible for activating nicotinamide adenine dinucleoside hydrolases (NADases), is crucial for the degradation of the NAD<sup>+</sup> cofactor. TNL-dependent immune signaling involves lipase-like proteins known as Enhanced Disease Susceptibility 1 (EDS1) and its partners Phytoalexin Deficient 4 (PAD4) and Senescence-Associated Gene 101 (SAG101). This immune system also requires helper NLR subfamilies, such as activated disease resistance 1 (ADR1) and N requirement gene 1 (NRG1). The catalytic activity of TIR domain proteins generates various small molecules reported to activate plant's immune responses. These small molecules bind to specific sites on EDS1-PAD4 and EDS1-SAG101, inducing structural changes in the EP domain, and subsequently enabling interaction with ADR1 or NRG1. Here, we will discuss the characteristics of these small molecules and describe their relationships with protein complexes based on their structural and biochemical characteristics. We will also discuss how these small molecules can activate immune pathways.

**Key words :** EDS1, NADases, NLR, resistosome, TNL

## 서 론

식물 세포에 존재하는 수용체(receptor)가 외부의 병원체를 인식하면 빠르게 세포 내 신호전달이 시작된다. 식물의 면역 수용체인 NLR 단백질(Nucleotide-binding and leucine-rich repeat receptor)은 병원성 분자(effectors)를 특이적으로 인식하여 신호 전달을 활성화시키며, 식물 세포 사멸(cell death)을 포함한 식물 면역반응(effector-triggered immunity)을 유도한다. 이때, NLR 단백질은 구조적 변화를 통해 올리고머(oligomers)를 형성하고, resistosome이라고 불리는 단백질 복합체(complex)를 이룬다[6, 19, 21]. N 말단 부위에 Toll/interleukin-1 receptor (TIR) 도메인을 갖고 있는 NLR 단백질(TNLs)은 NAD<sup>+</sup> 보조인자를 분해하는 효소인 NADases (nicotinamide adenine dinucleotide

hydrolases)를 암호화하고 있다[2, 13, 17, 34]. TNL-의존적 면역 신호전달은 lipase-like proteins로 알려진 EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1)과 파트너인 PAD4 (Phytoalexin Deficient 4), SAG101 (Senescence-Associated Gene 101)이 관여하며[12, 18, 33], hNLR (helper NLR subfamilies)로 알려진 ADR1 (Activated Disease Resistance 1), NRG1 (N requirement gene 1)이 필요하다[5, 7, 9, 10, 24, 25, 29, 32]. TIR 도메인 단백질 촉매 반응은 여러 형태의 소분자(small molecules)를 생성해 내며, 이들은 면역반응의 효과적인 활성을 촉매한다고 보고되었다[15, 16]. 이들은 EDS1-PAD4 및 EDS1-SAG101의 특정 위치에 결합하여 EP (EDS1 Phospholipase like domain)도메인의 구조 변화를 유도하며, 그 결과 ADR1 또는 NRG1과의 상호작용이 가능한 것으로 여겨진다[15, 16]. 따라서 소분자들과 단백질 복합체의 안정된 형태에 의하여 식물의 면역 반응이 활성화될 수 있는지 연구하는 것은 중요한 연구 주제이다. 본 논문에서는 이러한 소분자에 대해 알아보고, 이들과 단백질 복합체의 관계를 구조적 및 생화학적 특징에 기반해 기술하고자 한다. 또한, EDS1-PAD4와 EDS1-SAG101 복합체의 구조적 차이에 의하여 각각 고유한 역할을 수행하며, 이와 관련된 특정 상호작용을 통해 신호 전달 경로를

**\*Corresponding author**

Tel : +82-51-510-2263, Fax : +82-51-581-2962

E-mail : [ghlim16@pusan.ac.kr](mailto:ghlim16@pusan.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

활성화하는 방식에 영향을 미칠 수 있는지에 대하여 고찰해 보고자 한다.

## 본 론

### NLR 수용체 활성 메커니즘에 의한 식물 면역반응

식물의 NLR은 N-말단 신호 도메인 구조에 따라 TIR NLR (TNLs)과 coiled-coil (CC) NLR (CNLs)로 분류된다. 대표적인 CNL로 알려진 애기장대 ZAR1은 *Pseudomonas syringae*의 type III secreted effector (T3SE)인 HopZ1a를 인식하여 면역 반응을 유도한다[1, 3, 35, 36]. Cryo-EM (Cryo-electron microscopy) 구조분석을 통해 ZAR1이 다섯 개의 N-말단 도메인 protomer가 모여 오합체(pentamer)인 resistosome을 형성한다는 것을 확인하였다[8, 14]. 이 복합체는 막 관련 통로를 형성하여 세포 내외의 다양한 신호 전달을 조절한다. Resistosome이 형성되면, 이 복합체는 세포막에 삽입되어 막의 투과성을 변화시키고, 세포막에 통로를 형성하여  $Ca^{2+}$  이온의 유입을 촉진한다. 이는 식물 과민 반응(hypersensitive response, HR)이라고 알려진 세포 사멸을 유도하여 병원체의 확산을 막는다[14]. 이에 반해, TNLs로 알려진 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 RPP1 (Recognition of Peronospora parasitica 1)은 *Hyaloperonospora arabidopsidis* effector인 ATR1을[26, 30], 담배(*Nicotiana benthamiana*)의 Roq1은 *Xanthomonas*와 *Pseudomonas syringae* effector인 AvrRps4를 인식하여 식물의 면역반응을 유도한다[4, 23]. TIR 도메인의 NADase (nicotinamide adenine dinucleotide hydrolases) 활성화 부위는 진화적으로 보존된 특징을 가지고 있으며,  $NAD^+$ 가 접근할 수 있도록 구조적 변화를 유도한다[6]. RPP1과 Roq1은 effector를 인식하여 방어 반응을 활성화하는 과정에서 사합체(tetramer)를 형성한다[31]. 이 과정에서 NADase의 활성 부위가 노출되어 효소 활성이 촉발되어 신속하고 강력한 면역 반응을 유도한다[19]. NLR 활성화가 effector-triggered immunity (ETI) 하위 경로로 어떻게 전달되는지는 여전히 불분명하지만 CNLs와 TNLs 모두 비슷한 방식으로 ROS 생성, 전사 재프로그램, 살리실산(SA) 축적을 포함하여 국소 및 전신 저항을 강화할 것이라 생각된다[11, 20, 28]. CNL 수용체는 주로 막 관련 통로를 형성하여 직접적인 신호 전달을 촉진하는 반면, TNL 수용체는  $NAD^+$  가수분해 활성을 통해 신호 전달을 시작한다. 하지만 여전히 어떻게 TNL resistosome의 촉매반응에 의해 촉진된 EDS1 이형 이합체들이 hNLR들과 협력하여 식물의 방어기작을 일으키는지는 여전히 풀어야 할 문제였다. Huang 등[15]과 Jia 등[16]은 곤충 세포에 TNL과 함께 EDS1, PAD4, ADR1 또는 EDS1, SAG101, NRG1을 함께 발현시켜 소분자의 존재를 LC-HRMS (liquid chromatography high resolution mass spectrometry)를 통해 처음으로 발견하였다. 또한 cryo-EM을

통해 이들의 구조적 분석을 한 결과 EDS1 복합체와 소분자의 결합이 구조적 변화를 유도하고, hNLR로 알려진

ADR1 또는 NRG1과 완전한 복합체가 형성되어 면역반응을 활성화시키는 것을 확인하였다[15, 16] (Fig. 1).

### pRib-AMP/ADP에 의한 EDS1/PAD4의 활성화에 의한 ADR1 상호작용

Huang 등[15]은 LC-HRMS 분석 결과를 통해 EDS1-PAD4와 ADR1-L1의 상호작용을 유도하는 두 개의 소분자들을 규명하였다. TNLs 단백질의 NADase 촉매 활성은  $NAD^+$ 를 가수분해하여 Adenosine diphosphate ribose (ADPR)인 pRib-AMP와 pRib-ADP ( $m/z$  638.0331( $z=1^{-}$ ))가 생성됨을 밝혔다(Fig. 2). 이들은 EDS1과 PAD4의 EP도메인에 의해 형성된 포켓에 정확하게 결합하는 것이 확인된다. pRib-ADP의 5-phospho-beta-D-rebosyl 부분은 EDS1 잔기의 Asp<sup>469</sup>, Asn<sup>472</sup>, Tyr<sup>473</sup> 부분과 결합된다. 그리고 인산 그룹은 PAD4의 Arg<sup>314</sup>와 Arg<sup>425</sup>와 염다리(salt bridges)를 형성하며, Phe<sup>387</sup>과는 반데르발스 결합(Vander Waals bond)을 형성하고 있었다. 그렇기 때문에 pRib-ADP를 인식하기 위해서는 EDS1과 PAD4 모두 필요하다는 것을 알 수 있다. Huang 등[15]은 애기장대를 이용하여 EDS1-PAD4/pRib-ADR의 결합이 ADR1-L1의 결합에 영향을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였다. 그 결과 양전하를 띠고 있는 EDS1 (Arg<sup>493</sup>), PAD4 (Arg<sup>314</sup>, Lys<sup>380</sup>)의 염기를 알라닌(alanine)으로 치환된 잔기들은 pRib-ADP 인산 그룹과 전기적 상호작용이 약화되어 EDS1-PAD4와의 상호결합 능력이 감소하는 것이 확인되었다. 뿐만 아니라, EDS1-PAD4 복합체가 ADR1-L1과 상호작용 하는 능력까지 저하되었다. 이러한 결과는 EDS1-PAD4와 소분자가 정확한 결합을 통해 구조적 변화를 일으킨다고 생각할 수 있다. 반면, EDS1의 R425A, K478A, T492Y 돌연변이의 경우는 EDS1-PAD4-ADR1-L1의 상호작용에는 영향을 미치지 않았다. 하지만 이들 돌연변이와 PAD4의 Tyr<sup>383</sup> 돌연변이가 함께 일어나면, 아데노신 부분과의 적층(stack) 상호작용이 완전히 사라지게 되어, EDS1-PAD4-ADR1-L1의 상호작용에 영향을 주어 결과적으로 병원체 저항성 신호 전달이 일어나지 않았다. 따라서 EDS1-PAD4 복합체와 pRib-ADP의 상호작용이 ADR1을 결합할 수 있게 도와주는 것은 확실하지만, 이러한 결합이 어떻게 병 저항성에 관여할 수 있는지 정확하게 이해하기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

Cryo-EM을 통해서 apo-EDS1-PAD4 복합체의 각 Domain을 관찰한 결과 pRib-AMP/ADP가 특정한 위치에 결합하게 되면 PAD4의 EP domain의 Allosteric activation에 의해 10° 정도 반시계 방향으로 돌아가면서 구조적인 변화가 일어난다. 이로 인해 EDS1-PAD4 복합체는 입체성

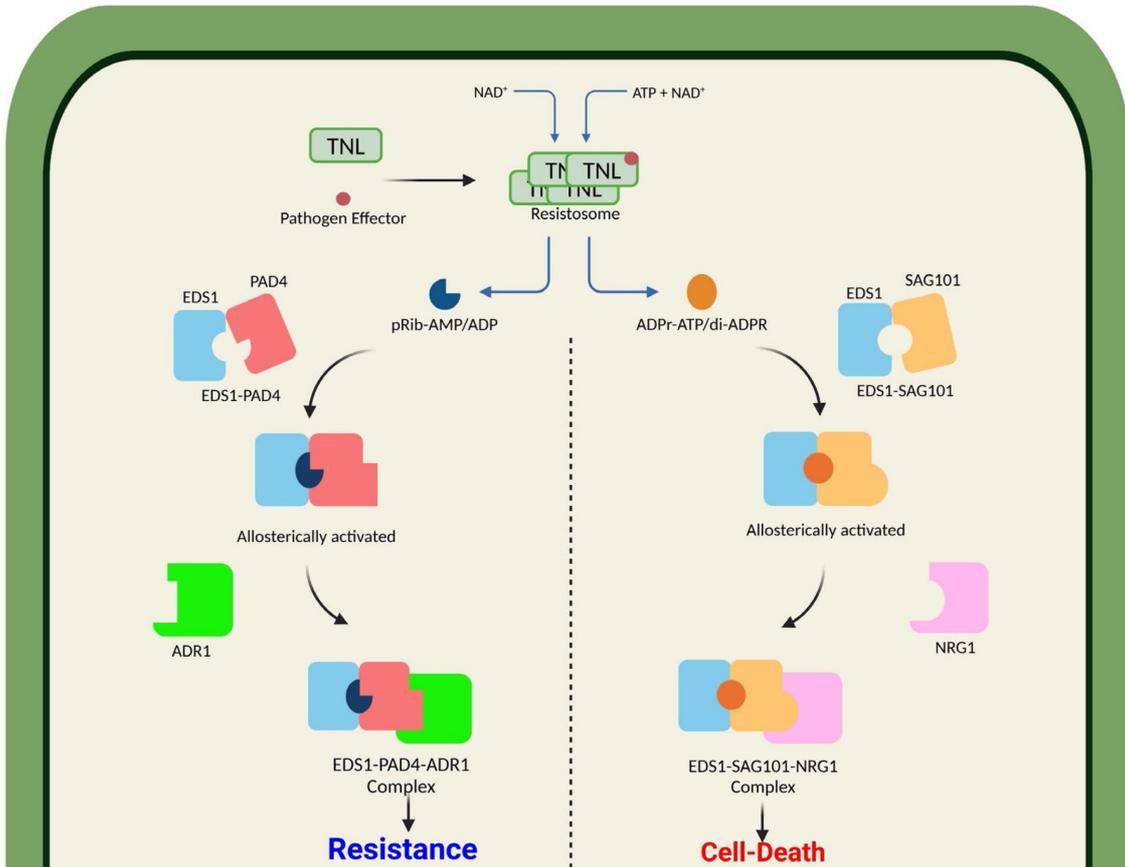


Fig. 1. TIR-domain enzymatic activities in plant immunity. Two distinct EDS1 heterodimer complexes are conformationally activated by different sets of TIR-domain catalyzed ribosylated nucleotides. Small molecules binding to either the EDS1-PAD4 or EDS1-SAG101 complexes facilitates their interaction with ADR1 or NRG1, respectively. This mechanism involves TNL- and TIR-only enzymes that produce small molecules such as pRib-ADP/AMP and ADPr-ATP/di-ADPR, which in turn activate the EDS1-PAD4-ADR1 and EDS1-SAG101-NRG1 immunity pathways. The figure was created using Biorender.com.

다른자리효과(Allosterically)적으로 ADR1의 결합을 촉진하여 식물 면역반응을 유도하는 것으로 보인다.

**ADPr-ATP/di-ADPR의 EDS1/SAG101에 의한 인식 메커니즘**

Jia 등[16]은 EDS1-SAG101과 NRG1A의 상호작용을 유도하는 소분자 ADP-ribosylated ADPR (di-ADPR)과 ADP-ribosylated ATP (ADPr-ATP)를 규명하였다(Fig. 2). EDS1-SAG101의 형성에 필요한 신호물질을 분리하기 위해, RPP1을 함께 발현시킨 후, EDS1-SAG101-X (신호물질) 결합체를 분리, 정제하여 LC-HRMS를 통해 질량 분석을 진행한 결과, 특정 물질이 분리되었고, 분해된 조각을 통해 그 구조를 유추하여, ADPr-ATP ( $m/z$  1047.0530( $z=1^{-}$ ))를 밝혀냈다. EDS1-SAG101 복합체에서는 EDS1-PAD4복합체와는 다르게 pRib-ADP는 발견되지 않았다. 이 결과는 EDS1-PAD4와는 별도의 신호물질이 특이적으로 식물 면역반응에 관여할 것이라는 것을 생각해 볼 수 있다. 다음으로

ADPr-ATP가 EDS1-SAG101-NRG1의 상호작용에 관여하는지 확인하기 위해 IP를 진행한 결과 ADPr-ATP가 존재할 경우에만 복합체가 형성되는 것을 확인하였다[15]. 추가적으로, ADPr-ATP가 TIR 도메인의 촉매반응 활성화로 인해 생성되는 것인지 확인하는 실험을 위해 RBA1을 이용하였다[22]. TIR을 포함하고 있는 RBA1<sup>WT</sup>과 NADase 기능이 결핍된 RBA1<sup>E86A</sup>을 담배에 과발현시켜 확인해 본 결과, RBA1<sup>WT</sup>가 과발현된 담배 앞에서만 ADPr-ATP가 축적된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 EDS1-SAG101 복합체의 활성화가 TIR촉매에 의해 생성된 ADPr-ATP의 결합에 의해 선택적으로 이루어지며, 특정 잔기들이 이 상호작용에 필수적임을 보여준다[16].

Huang 등[15]은 Cryo-EM을 이용하여 EDS1-SAG101복합체의 입체 구조를 확인하여 ADPr-ATP가 단백질 복합체의 어느 부위에 결합하는지를 확인하였다. ADPr-ATP가 포함하고 있는 pRib-ADP부분은 수소결합과 극성 상호작용하며, nucleobase adenine 부분은 EDS1의 His<sup>476</sup> 잔기

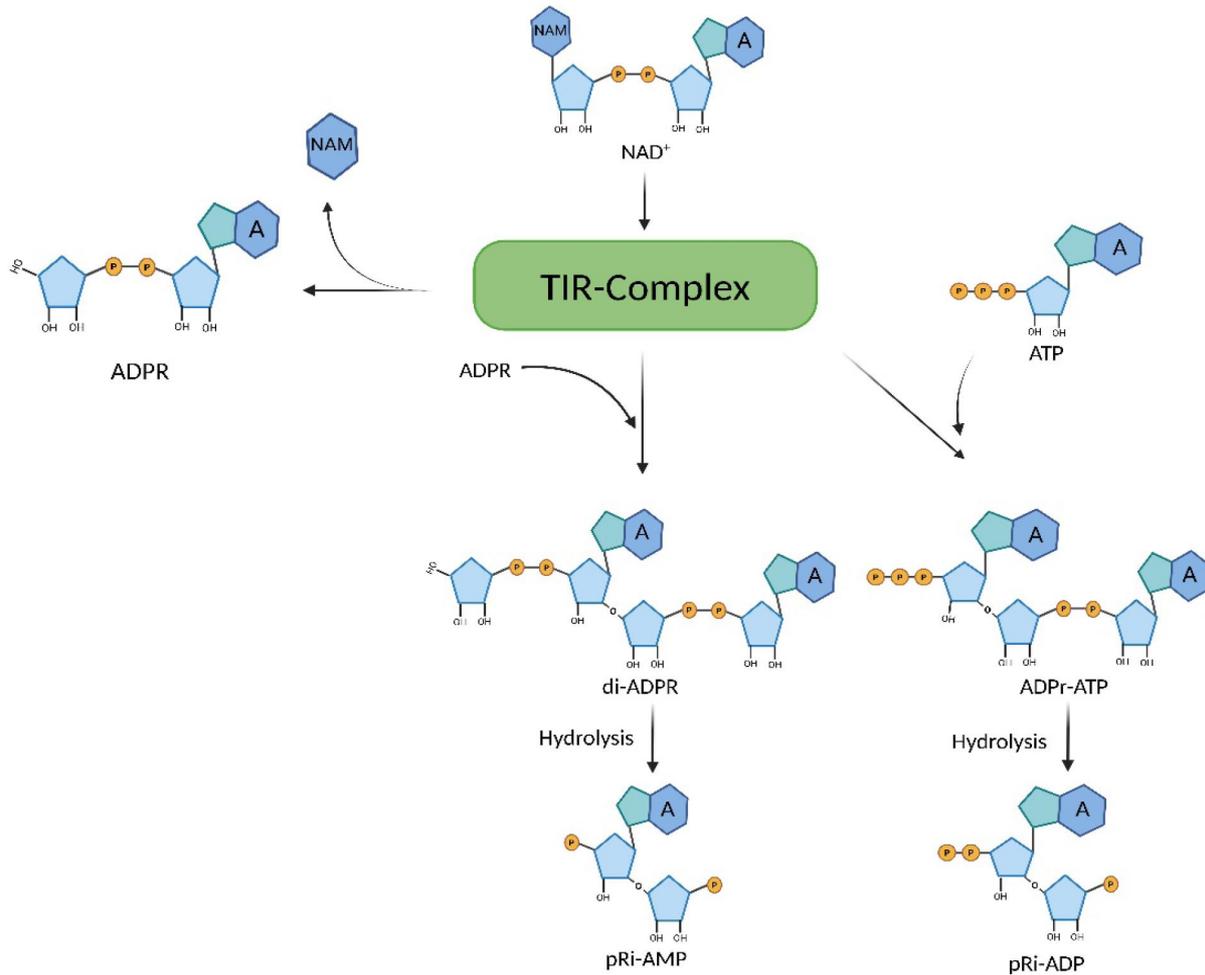


Fig. 2. TIR-catalyzed ADP-ribosylation reaction in plant. An illustration showing a potential mechanism for the production of ADPR, di-ADPR, ADPr-ATP, pRib-AMP and pRib-ADP by TIR catalyzed reactions. Abbreviations used are Adenosine diphosphate ribose (ADPR), ADP-ribosylated ADPR (di-ADPR) and ADP-ribosylated ATP (ADPr-ATP), 2'-(5''-phosphoribosyl)-5'-adenosine mono-/di-phosphate (pRib-AMP/ADP). The figure was created using Biorender.com.

뿐만 아니라 SAG101의 Met<sup>384</sup>, Leu<sup>438</sup>에 소수성 패킹 되어 있었다. 또한 인산화 그룹은 SAG101 Lys<sup>371</sup>과 반테르발스 결합을 하는 것으로 보인다.

TIR, NAD<sup>+</sup>, ATP, ADP, ADPR의 존재 유무에 따라 EDS1-SAG101-NPRG1A 복합체가 형성되는지 확인하는 과정에서, ATP가 존재하지 않는 상황에서도 복합체가 형성되는 것을 확인하였다. 이는 ADPr-ATP 이외의 물질이 존재함을 의미하였고, Huang 등[15]은 LC를 통해 확인해 본 결과 다른 물질이 확인하였고 이 물질을 추정해 본 결과 di-ADPR (*m/z* 1099.1276(*z*=1<sup>-</sup>))이 발견되었다. 또한 di-ADPR이 존재할 때 apo-EDS1-SAG101과 함께 NRG1A가 결합하는 것을 IP를 통해 다시 한번 증명하였다. TIR 촉매에 의한 ADPr-ATP의 생성에 있어 NAD<sup>+</sup> 가수분해가 필수적이며 이 과정에서 ADPR이 생성된다. TIR촉매에 의해 생겨난 생성물이 EDS1-SAG101복합체에 NAG1이 상호작용하는 것을 유도할 수 있는지 확인하기 위해, RPS4-TIR, ADPR,

ATP, ADP, NAD<sup>+</sup>의 여러 조합을 각각 배양하였다. 그 결과, 반드시 NAD<sup>+</sup>이 존재할 때 EDS1-SAG1-NAG1의 결합은 형성되는 것을 알 수 있었다. 곤충 세포에 RPS4-TIR, ATP, NAD<sup>+</sup>를 함께 발현시킨 결과 di-ADPR, ADPr-ATP 모두 형성되었고, 특히 di-ADPR이 주로 형성되었다. 반대로 RPS4-TIR 대신 RPP1을 곤충 세포에서 발현시킨 후 추출한 EDS1-SAG101 복합체에서는 di-ADPR보다 ADPr-ATP가 훨씬 많이 발견됨으로써 affinity가 더 높음을 추론할 수 있다. 이러한 이유는 TIR oligomer 구조가 ADPR의 결합에 필수적이며, 이후 TIR의 NADase에 의해 ATP의 ADPR의 전환이 이루어지며, ADPr-ATP, di-ADPR의 형성이 이루어지는 데 영향을 미치는 것으로 생각된다[15].

#### ADPr-ATP/di-ADPR에 의한 EDS1/SAG101의 구조적 변화에 의한NRG1상호작용

EDS1-PAD4 와 EDS1-SAG101의 구조를 비교해 보면,

유사한 위치에서 각각 pRib-ADP, ADPr-ATP와 결합함을 알 수 있다[15, 16]. 하지만 PAD4와 SAG101의 구조를 자세히 비교해 보면, 두 신호물질은 크기에 현저한 차이가 있는 것이 확인된다. pRib-ADP와의 결합에 필요한 아미노산의 경우 PAD4와 SAG101 둘 다 어느 정도 유사하지만, ADPr-ATP와 결합하는 위치(pRib-ADP보다 더 큰 공간에 필요한 영역)에 대해서는, PAD4와 SAG101의 구조가 매우 다른 것이 확인되었다. SAG101의 Met<sup>304</sup>과 Asn<sup>380</sup>을 PAD4의 Arg<sup>314</sup>과 Phe<sup>387</sup>로 치환하면 ADPr-ATP와 결합하던 공간이 막히게 되는 것이 확인된다[15, 16].

Jia 등[16]은 애기장대 EDS1-SAG101의 돌연변이를 이용하여 NRG1A와의 상호작용에 미치는 영향을 확인하였다. EDS1의 돌연변이(H476Y)의 경우 AvrRps4에 의해 유도되는 세포 사멸(cell death)이 현저히 줄어드는 것이 확인되었지만, EDS1-SAG101-NRG1A 상호작용에는 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 EDS1-SAG101-NRG1A의 완벽한 복합체가 세포 사멸을 유도하는 데 필수적이지 않을 수 있음을 보여준다. 하지만, EDS1 (H476Y)를 SAG101 (N380F)와 함께 발현시켰을 경우에는 EDS1-SAG101-NRG1A의 결합이 되지 않는 것을 확인하였다. EDS1과 상호작용에 중요한 PAD4의 Arg<sup>314</sup>는 SAG101의 경우 Met<sup>304</sup>에 해당하는 것으로 보이며, 이 역시 돌연변이가 일어날 경우 NRG1과의 상호작용 능력이 감소하는 것이 확인되었다. Jia 등[16]은 apo-EDS1-SAG101 결정 구조를 ADPr-ATP 결합 EDS1-SAG101의 cryo-EM 구조와 겹쳐본 결과, EDS1의 구조는 변화가 없지만, SAG101의 경우 EP 도메인에서는 현저한 구조적 차이가 있는 것을 확인하였다. ADPr-ATP가 결합된 SAG101의 EP 도메인은 apo 형태의 SAG101에 비해 반시계 방향으로 약 15도 회전하였으며,  $\alpha 16$ 이 완전한 해체되고,  $\alpha 14$ 와  $\alpha 15$ 의 N-말단이 EDS1 쪽으로 이동하며, SAG101의  $\alpha 11$ 이 EDS1에서 약 4.0 Å 떨어져 있는 것을 확인했다. 이러한 구조적 분석은 ADPr-ATP 결합이 SAG101 EP 도메인에서 형태 변화를 일으켜 EDS1-SAG101이 NRG1A와 상호작용할 수 있게 함을 입증했다. EDS1-PAD4에 결합된 pRib-ADP와 마찬가지로, EDS1-SAG101에 결합된 ADPr-ATP는 거의 완전히 묻혀 있어 이 소분자가 NRG1A와 직접 상호작용할 가능성이 낮은 것으로 생각된다.

#### EDS1-PAD4와 EDS1-SAG101의 선택적 소분자와의 결합에 의한 면역 메커니즘

Huang 등[15]과 Jia 등[16]은 공통된 생화학적 활성에도 불구하고, EDS1-PAD4-ADR1 및 EDS1-SAG101-NRG1 신호 복합체는 특정 면역 반응에 대한 선호도를 보이는 것을 증명하였다. 소분자에 의해 유도된 EDS1 이합체의 구조적 변화는 ADR1 및 NRG1과의 직접적인 상호작용을 촉진한다[15, 16]. EDS1 이합체에 의해 선택된 소분자와

그들의 생체 내 면역 기능에 영향을 미치는 아미노산은 EDS1-PAD4와 EDS1-SAG101 EP 도메인 표면에 위치해 있는 것을 확인했다. 예를 들어, EDS1 돌연변이(H476Y)는 EDS1-PAD4에는 영향을 미치지 않지만 EDS1-SAG101의 리간드 결합 부위를 방해하여 숙주 세포 사멸을 억제하면서도 애기장대에서 박테리아 저항성에는 큰 영향을 미치지 않았다[16, 27]. 또한 EDS1과 PAD4의 과발현은 병원체 저항성을 증가시키지만 과민성반응은 증가시키지 않았다[16, 27]. pRib-ADP와 pRib-AMP는 ADR1과의 EDS1-PAD4 상호작용을 강하게 촉진하지만, EDS1-SAG101과의 NRG1A 상호작용을 촉진하는 능력은 낮아 과민성반응 상관없이 효과적인 식물 면역을 유도할 수 있다[15, 16].

## 결론

TIR 도메인 단백질이 NADase 활성을 통해 특정 신호 분자를 생성하여 면역 반응을 유도하는 과정이 밝혀졌다. TIR 촉매 소분자가 EDS1-PAD4와 EDS1-SAG101을 활성화하는 광범위한 알로스테릭 메커니즘(allosteric mechanisms)인 EDS1 이합체의 구조적 변화를 포함하며, hNLR과의 직접적인 결합을 촉진하여 이들의 Ca<sup>2+</sup> 투과성 이온 채널 활성을 증가시킬 가능성을 열어 두었다. 또한 소분자가 ADR1 또는 NRG1과의 유도된 EDS1-PAD4 또는 EDS1-SAG101 상호작용에 직접적으로 참여하지 않고, 소분자 결합에 의해 유도된 알로스테릭 변화가 특정 보조 NLR 결합을 위한 새로운 단백질 표면을 생성할 가능성이 크다는 것을 알려주었다. 이를 통해 EDS1-PAD4와 EDS1-SAG101 이합체가 병원체가 침입하였을 때 구조적 변화를 통해 hNLR인 ADR1과 NRG1과 상호작용을 할 수 있으며, 결과적으로 면역 반응과 세포 사멸을 빠르게 활성화시킬 수 있는지가 설명이 된다. TIR-촉매 분자의 리간드 및 수용체 메커니즘이 종자식물 전반에 걸쳐 보존되어 있기 때문에 이러한 메커니즘에 대한 이해는 식물 면역을 연구하는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대한다. 예를 들어, 특정 신호 분자의 생성을 조절하여 면역 반응을 최적화하는 전략을 연구할 수 있는 가능성을 제시하였다. 지금까지 밝혀지지 않은 2차 전달자로 새로운 소분자가 있을 것을 기대할 수 있으며 이를 찾기 위한 더 많은 연구가 필요할 것이다.

## 감사의 글

이 과정은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Adachi, H., Sakai, T., Kourelis, J., Pai, H., Gonzalez Hernandez, J. L., Utsumi, Y., Seki, M., Maqbool, A. and Kamoun, S. 2023. Jurassic NLR: Conserved and dynamic evolutionary features of the atypically ancient immune receptor ZAR1. *Plant Cell* **35**, 3662-3685.
- Bayless, A. M. and Nishimura, M. T. 2020. Enzymatic functions for Toll/interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system. *Front. Genet.* **11**, 539.
- Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y., Dang, S., Xu, J., Hu, M., Wang, J., Zou, M. and Deng, Y. 2021. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell* **184**, 3528-3541. e12.
- Bi, G. and Zhou, J. M. 2021. Regulation of cell death and signaling by pore-forming resistosomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **59**, 239-263.
- Bonardi, V., Tang, S., Stallmann, A., Roberts, M., Cherkis, K. and Dangl, J. L. 2011. Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 16463-16468.
- Burdett, H., Bentham, A. R., Williams, S. J., Dodds, P. N., Anderson, P. A., Banfield, M. J. and Kobe, B. 2019. The plant "resistosome": Structural insights into immune signaling. *Cell Host Microbe* **26**, 193-201.
- Castel, B., Ngou, P. M., Cevik, V., Redkar, A., Kim, D. S., Yang, Y., Ding, P. and Jones, J. D. 2019. Diverse NLR immune receptors activate defence via the RPW 8-NLR NRG 1. *New Phytol.* **222**, 966-980.
- Chen, J., Li, M., Liu, L., Chen, G. and Fu, Z. Q. 2021. ZAR1 resistosome and helper NLRs: Bringing in calcium and inducing cell death. *Mol. Plant.* **14**, 1234-1236.
- Dong, O. X., Tong, M., Bonardi, V., El Kasmī, F., Woloshen, V., Wünsch, L. K., Dangl, J. L. and Li, X. 2016. TNL-mediated immunity in *Arabidopsis* requires complex regulation of the redundant ADR 1 gene family. *New Phytol.* **210**, 960-973.
- Dongus, J. A. and Parker, J. E. 2021. EDS1 signalling: At the nexus of intracellular and surface receptor immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **62**, 102039.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lasig, R., Witte, C. P., Schulze, W. X. and Romeis, T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 8744-8749.
- Gantner, J., Ordon, J., Kretschmer, C., Guerois, R. and Stuttmann, J. 2019. An EDS1-SAG101 complex is essential for TNL-mediated immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* **31**, 2456-2474.
- Horsefield, S., Burdett, H., Zhang, X., Manik, M. K., Shi, Y., Chen, J., Qi, T., Gilley, J., Lai, J. S. and Rank, M. X. 2019. NAD<sup>+</sup> cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways. *Science* **365**, 793-799.
- Hu, M., Qi, J., Bi, G. and Zhou, J. M. 2020. Bacterial effectors induce oligomerization of immune receptor ZAR1 *in vivo*. *Mol. Plant.* **13**, 793-801.
- Huang, S., Jia, A., Song, W., Hessler, G., Meng, Y., Sun, Y., Xu, L., Laessle, H., Jirschtzka, J. and Ma, S. 2022. Identification and receptor mechanism of TIR-catalyzed small molecules in plant immunity. *Science* **377**, eabq3297.
- Jia, A., Huang, S., Song, W., Wang, J., Meng, Y., Sun, Y., Xu, L., Laessle, H., Jirschtzka, J. and Hou, J. 2022. TIR-catalyzed ADP-ribosylation reactions produce signaling molecules for plant immunity. *Science* **377**, eabq8180.
- Lapin, D., Johandrees, O., Wu, Z., Li, X. and Parker, J. E. 2022. Molecular innovations in plant TIR-based immunity signaling. *Plant Cell* **34**, 1479-1496.
- Lapin, D., Kovacova, V., Sun, X., Dongus, J. A., Bhandari, D., von Born, P., Bautor, J., Guarneri, N., Rzemieniewski, J. and Stuttmann, J. 2019. A coevolved EDS1-SAG101-NRG1 module mediates cell death signaling by TIR-domain immune receptors. *Plant Cell* **31**, 2430-2455.
- Ma, S., Lapin, D., Liu, L., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., Logemann, E., Yu, D., Wang, J. and Jirschtzka, J. 2020. Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science* **370**, eabe3069.
- Maekawa, T., Cheng, W., Spiridon, L. N., Töller, A., Lukasik, E., Saijo, Y., Liu, P., Shen, Q. H., Miçluta, M. A. and Somssich, I. E. 2011. Coiled-coil domain-dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death. *Cell Host Microbe* **9**, 187-199.
- Martin, R., Qi, T., Zhang, H., Liu, F., King, M., Toth, C., Nogales, E. and Staskawicz, B. J. 2020. Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ. *Science* **370**, eabd9993.
- Nishimura, M. T., Anderson, R. G., Cherkis, K. A., Law, T. F., Liu, Q. L., Machius, M., Nimchuk, Z. L., Yang, L., Chung, E. H. and El Kasmī, F. 2017. TIR-only protein RBA1 recognizes a pathogen effector to regulate cell death in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, E2053-E2062.
- Prautsch, J., Erickson, J. L., Özyürek, S., Gormanns, R., Franke, L., Lu, Y., Marx, J., Niemyer, F., Parker, J. E. and Stuttmann, J. 2023. Effector XopQ-induced stomule formation in *Nicotiana benthamiana* depends on ETI signaling components ADR1 and NRG1. *Plant Physiol.* **191**, 161-176.
- Pruitt, R. N., Locci, F., Wanke, F., Zhang, L., Saile, S. C., Joe, A., Karelina, D., Hua, C., Fröhlich, K. and Wan, W. L. 2021. The EDS1-PAD4-ADR1 node mediates *Arabidopsis* pattern-triggered immunity. *Nature* **598**, 495-499.
- Qi, T., Seong, K., Thomazella, D. P., Kim, J. R., Pham, J., Seo, E., Cho, M. J., Schultink, A. and Staskawicz, B.

- J. 2018 NRG1 functions downstream of EDS1 to regulate TIR-NLR-mediated plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E10979-E10987.
26. Rehmany, A. P., Gordon, A., Rose, L. E., Allen, R. L., Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Kamoun, S., Tyler, B. M., Birch, P. R. and Beynon, J. L. 2005. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* **17**, 1839-1850.
27. Rietz, S., Stamm, A., Malonek, S., Wagner, S., Becker, D., Medina-Escobar, N., Corina Vlot, A., Feys, B. J., Niefind, K. and Parker, J. E. 2011. Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. *New Phytol.* **191**, 107-119.
28. Ross, A., Yamada, K., Hiruma, K., Yamashita-Yamada, M., Lu, X., Takano, Y., Tsuda, K. and Saijo, Y. 2014. The *Arabidopsis* PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *EMBO J.* **33**, 62-75.
29. Saile, S. C., Jacob, P., Castel, B., Jubic, L. M., Salas Gonzáles, I., Bäcker, M., Jones, J. D., Dangl, J. L. and El Kasmí, F. 2020. Two unequally redundant "helper" immune receptor families mediate *Arabidopsis thaliana* intracellular "sensor" immune receptor functions. *PLoS Biol.* **18**, e3000783.
30. Song, W., Liu, L., Yu, D., Bernardy, H., Jirschitzka, J., Huang, S., Jia, A., Jemielniak, W., Acker, J. and Laessle, H. 2024. Substrate-induced condensation activates plant TIR domain proteins. *Nature* **627**, 847-853.
31. Tian, L. and Li, X. 2020. Enzyme formation by immune receptors. *Science* **370**, 1163-1164.
32. Sun, X., Lapin, D., Feehan, J. M., Stolze, S. C., Kramer, K., Dongus, J. A., Rzemieniewski, J., Blanvillain Bau-fumé, S., Harzen, A. and Bautor, J. 2021. Pathogen effector recognition-dependent association of NRG1 with EDS1 and SAG101 in TNL receptor immunity. *Nat. Commun.* **12**, 3335.
33. Wagner, S., Stuttmann, J., Rietz, S., Guerois, R., Brunstein, E., Bautor, J., Niefind, K. and Parker, J. E. 2013. Structural basis for signaling by exclusive EDS1 heteromeric complexes with SAG101 or PAD4 in plant innate immunity. *Cell Host Microbe* **14**, 619-630.
34. Wan, L., Essuman, K., Anderson, R. G., Sasaki, Y., Monteiro, F., Chung, E. H., Osborne Nishimura, E., DiAntonio, A., Milbrandt, J. and Dangl, J. L. 2019. TIR domains of plant immune receptors are NAD<sup>+</sup>-cleaving enzymes that promote cell death. *Science* **365**, 799-803.
35. Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H. W., Zhou, J. M. and Chai, J. 2019. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* **364**, eaav5870.
36. Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N. and Wang, H. W. 2019. Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* **364**, eaav5868.

## 초록 : TIR 촉매반응에 의해 생성된 소분자들의 식물면역반응에서의 역할

배성현<sup>1,2</sup> · 박상현<sup>1,2</sup> · 차예림<sup>1,2</sup> · 전다원<sup>1,2</sup> · 임가현<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 생명과학과, <sup>2</sup>부산대학교 생명시스템연구소)

식물 세포에 존재하는 수용체(receptor)가 외부의 병원체를 인식하면 빠르게 세포 내 신호전달이 시작된다. 식물의 면역 수용체인 NLR단백질(Nucleotide-binding and leucine-rich repeat receptor)은 병원성 분자(effectors)를 특이적으로 인식하여 신호 전달을 활성화시키며, 식물 세포 사멸(cell death)을 포함한 식물 면역반응(effector-triggered immunity)을 유도한다. TNL-의존적 면역 신호전달은 lipase-like proteins로 알려진 EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1)과 파트너인 PAD4 (Phytoalexin Deficient 4), SAG101 (Senescence-Associated Gene 101)이 관여하며 ADR1 (Activated Disease Resistance 1), NRG1(N requirement gene 1)이 필요하다. TIR 도메인 단백질 촉매 반응은 여러 형태의 소분자를 생성해 내며, 이들은 식물 면역반응의 효과적인 활성을 촉매하는 것으로 보고되었다. 이들은 EDS1-PAD4 및 EDS1-SAG101의 특정 위치에 결합하여 EP도메인의 구조 변화를 유도하며, 그 결과 ADR1 또는 NRG1과의 상호작용이 가능한 것으로 여겨진다. 따라서 소분자들과 단백질 복합체의 안정된 형태에 의하여 식물의 면역 반응이 활성화될 수 있는지 연구하는 것은 중요한 연구 주제이다. 본 논문에서는 이러한 소분자에 대해 알아보고, 이들과 단백질 복합체의 관계를 구조적 및 생화학적 특징에 기반해 기술하고자 한다. 또한, EDS1-PAD4와 EDS1-SAG101복합체의 구조적 차이에 의하여 각각 고유한 역할을 수행하며, 이와 관련된 특정 상호작용을 통해 신호 전달 경로를 활성화하는 방식에 영향을 미칠 수 있는지에 대하여 고찰해 보고자 한다.