



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2022년 2월

석사학위 논문

애기장대의 Toll/interleukin-1  
receptor 도메인을 암호화하는  
*AtTX11/12* 유전자의 기능적인 분석

조선대학교 대학원

글로벌바이오융합학과

임 수 민

애기장대의 Toll/interleukin-1  
receptor 도메인을 암호화하는  
*AtTX11/12* 유전자의 기능적인 분석

Functional analysis of *AtTX11/12* encoding a  
Toll/interleukin-1 receptor domain in Arabidopsis

2022년 2월 25일

조선대학교 대학원

글로벌바이오융합학과

임 수 민

애기장대의 Toll/interleukin-1  
receptor 도메인을 암호화하는  
*AtTX11/12* 유전자의 기능적인 분석

지도교수 송 상 기

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2021년 10월

조선대학교 대학원

글로벌바이오융합학과

임 수 민

## 임수민의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 조태오 (인)

위원 조선대학교 부교수 송상기 (인)

위원 조선대학교 조교수 이한용 (인)

2021년 12월

조선대학교 대학원

## CONTENTS

LIST OF TABLES.....	iv
LIST OF FIGURES.....	v
ABBREVIATIONS.....	vii
ABSTRACT.....	x
국문초록.....	xiii
I. 서론.....	1
1. 식물의 저항성 유전자.....	2
2. 저항성 단백질들의 올리고머화.....	3
3. 비표준적인 TNL.....	4
4. TNL 하류에서 작용하는 두 종류의 식물 면역 신호 경로.....	4
5. 식물의 TIR 신호 전달 과정에서 NADase 활성의 중요성.....	5
6. TIR의 활성화에 요구되는 TIR 상호작용 접속면.....	7
7. 온도가 TIR의 활성화에 미치는 영향.....	8

8. 본 연구의 목적.....	9
II. 재료 및 방법.....	10
1. 식물 재료 및 생장 조건.....	10
2. 배지의 조성.....	10
2.1. Luria broth 배지.....	10
2.2. MS 배지.....	11
3. 식물의 게놈 DNA 추출.....	11
4. 식물 발현 벡터 제작.....	12
4.1. C-말단 결실 돌연변이의 제조.....	12
4.2. 위치 지정 돌연변이의 제조.....	12
4.3. 무작위적 점 돌연변이의 제조.....	13
4.4. 배추과 작물에서 유래한 <i>AtTX12</i> 유사 유전자들의 발현 벡터 제작 ... ..	13
5. 아그로박테리움을 매개로 한 애기장대의 형질전환.....	18
6. 현미경 관찰법.....	18
7. Reverse transcription (RT)-PCR 분석.....	18
III. 결과.....	20

1. AtTX12는 TIR의 자가결합 및 효소 활성화에 필수적인 보존된 아미노산들과 식물 TIR 도메인의 전형적인 3차원적 구조를 간직하고 있다.....	20
2. AtTX12의 성장저해능을 위해서 $\alpha E$ 보존이 필수적이다.....	25
3. <i>AtTX12</i> 의 위치 지정 돌연변이와 무작위적 돌연변이 분석을 통한 성장저해능에 핵심적인 아미노산 탐색.....	29
4. <i>AtTX11</i> 의 무작위적 돌연변이 분석을 통한 성장저해능에 핵심적인 아미노산 탐색.....	36
5. 성장저해능이 소실된 AtTX11/12 돌연변이는 <i>PR1</i> 의 발현을 유도하지 못한다.....	40
6. 무에서 유래한 <i>AtTX12</i> 유사 유전자인 <i>RsTX12</i> 는 애기장대에서 성장저해능을 나타냈다.....	42
7. AtTX12의 온도 비민감성 활성화에 관여하는 영역 및 아미노산 선별 및 분석.....	50
IV. 논의.....	55
V. 참고문헌.....	62

## LIST OF TABLES

Table 1. List of primers for PCR.....	15
Table 2. List of site-directed mutations introduced into <i>AtTX12</i> and their effects on growth inhibition activity of <i>AtTX12</i> .....	32
Table 3. List of random mutations introduced into <i>AtTX12</i> and their effects on growth inhibition activity of <i>AtTX12</i> .....	34
Table 4. List of random mutations introduced into <i>AtTX11</i> and their effects on growth inhibition activity of <i>AtTX11</i> .....	38
Table 5. The effects of the overexpression of <i>AtTX12</i> -like genes originated from crops of Brassicaceae on growth inhibition of transgenic <i>Arabidopsis</i> seedlings.....	47

## LIST OF FIGURES

Figure 1. Diagrams of the expression vector constructs for C-terminal deletion mutants and site-directed mutants of <i>AtTX12</i> under the regulation of 5x <i>UAS</i> promoter.....	16
Figure 2. Diagrams of the expression vector constructs for random mutants of <i>AtTX11/12</i> and <i>AtTX12-like</i> genes originated from crops of Brassicaceae under the regulation of 5x <i>UAS</i> promoter.....	17
Figure 3. Multiple sequence alignment and secondary structure prediction of plant TIR domains.....	23
Figure 4. Structural modeling of <i>AtTX12</i> using Phyre2 comparing to RPP1.....	24
Figure 5. A schematic diagram of C-terminal deletion mutants of <i>AtTX12</i> and the representative phenotypes of seedlings overexpressing the C-terminal deletion mutants.....	27
Figure 6. The overexpression of inactive C-terminal deletion mutants of <i>AtTX12</i> failed to induce the expression of both <i>PR1</i> and <i>BGL2</i> in transgenic plants.....	28
Figure 7. The representative phenotypes of seedlings overexpressing site-directed mutants of <i>AtTX12</i> .....	33
Figure 8. The representative phenotypes of seedlings overexpressing random mutants of <i>AtTX12</i> .....	35
Figure 9. The representative phenotypes of seedlings overexpressing random mutants of <i>AtTX11</i> .....	39

Figure 10. The overexpression of inactive point mutants of *AtTX11/12* failed to induce the expression of both *PR1* and *BGL2*.....41

Figure 11. Multiple sequence alignment and secondary structure prediction of TIR domains from *Arabidopsis* and *AtTX12*-like proteins originated from crops of Brassicaceae.....45

Figure 12. Phylogenetic tree of TIR domains from *Arabidopsis* and *AtTX12*-like proteins originated from crops of Brassicaceae.....46

Figure 13. The representative phenotypes of transgenic seedlings overexpressing the *AtTX12*-like genes originated from crops of Brassicaceae.....48

Figure 14. The overexpression of *RsTX12* induced the expression of both *PR1* and *BGL2*.....49

Figure 15. The representative phenotypic changes in seedlings overexpressing C-terminal deletion mutants of *AtTX12* depending on different temperature conditions.....52

Figure 16. The representative phenotypic changes in seedlings overexpressing various point mutants of *AtTX12* depending on different temperature conditions.....53

Figure 17. The representative phenotypic changes of *eds1-2 Q2610>>AtTX12* seedlings depending on different temperature conditions.....54

Figure 18. Model of EDS1-dependent and putative EDS1-independent/temperature-insensitive growth inhibition pathway of *AtTX12*.....61

## ABBREVIATIONS

ADP	adenosine diphosphate
ADPR	ADP-ribose
ADR1	Activated Disease Resistance 1
ATP	adenosine triphosphate
<i>BGL2</i>	<i>β-1,3-GLUCANASE 2</i>
<i>BobTX12</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> <i>AtTX12</i> -like gene
<i>BoiTX12</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> <i>AtTX12</i> -like gene
c-ADPR	cyclic-ADPR
CC	Coiled coil
CNLs	CC-NLRs
Col-0	Columbia-0
<i>EDS1</i>	<i>ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1</i>
EF-Tu	elongation factor thermo unstable
<i>EF1</i>	<i>ELONGATION FACTOR1</i>
ETI	effector-triggered immunity
GFP	green fluorescent protein
HR	hypersensitive response
LRR	leucine rich repeat
MCS	multiple cloning sites
MHD	methionine-histidine-aspartate
MLA10	Polymorphic barley mildew A10
MS	Murashige and Skoog

MSA	multiple sequence alignment
NAAD	nicotinic acid adenine dinucleotide
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NADase	NAD hydrolase
NAM	nicotinamide
NB	nucleotide binding
NLR	nucleotide binding leucine rich repeat
NOD	nucleotide binding oligomerization domain
<i>NRG1</i>	<i>N-requirement gene 1</i>
<i>PAD4</i>	<i>PHYTOALEXIN DEFICIENT 4</i>
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PAUP	phylogenetic analysis using parsimony
PCR	polymerase chain reaction
Pfu-PCR	<i>Pyrococcus furiosus</i> -PCR
P-loop	phosphate-binding loop
<i>PR1</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1</i>
<i>PR2</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2</i>
PRRs	pattern recognition receptors
PTI	PAMP-triggered immunity
R	resistance
<i>RBA1</i>	<i>Response to HopBA1</i>
<i>ROQ1</i>	<i>Recognition of XopQ1</i>
<i>RPP1</i>	<i>Recognition of Peronospora parasitica</i>

<i>RPS4</i>	<i>Resistance to Pseudomonas syringae 4</i>
<i>RPV1</i>	<i>Resistance to Plasmopara viticola 1</i>
<i>RPW8</i>	<i>Resistance to powdery mildew 8</i>
<i>RRS1</i>	<i>Recognition of Ralstonia solanacearum 1</i>
<i>RsTX12</i>	<i>Raphanus sativus AtTX12-like gene</i>
RT-PCR	reverse transcription-PCR
<i>SAG101</i>	<i>SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101</i>
<i>SARM1</i>	<i>sterile alpha and TIR motif-containing 1</i>
SNC1	suppressor of <i>npr1-1</i> , constitutive 1
Taq-PCR	<i>Thermus aquaticus</i> -PCR
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor
TNL	TIR-NLR
TX	TIR-X
v-cADPR	variant of cyclic ADPR
XopQ	<i>Xanthomonas</i> outer protein Q

## ABSTRACT

### Functional analysis of *AtTX11/12* encoding a Toll/interleukin-1 receptor domain in *Arabidopsis*

Su-Min Lim

Advisor : Assistant Prof. Sang-Kee Song, Ph.D.

Department of Integrative Biological Sciences,

Graduate School of Chosun University

Plants deploy various resistance (R) proteins to protect themselves from pathogen attacks. Although there exist 30 genes encoding Toll-interleukin-1 receptor-only protein (TX) belonging to non-canonical R proteins in the genome of *Arabidopsis thaliana*, the roles of only a few TXs have been elucidated yet. The overexpression of *AtTX11/12* under the regulation of a root-specific enhancer trap line, Q2610 (*Q2610>>AtTX11/12*) led to severe growth inhibition, which was not suppressed under the high temperature condition. In this study I tried to screen the protein regions and essential amino acids for the growth inhibition and temperature-insensitive activity of *AtTX11/12* by introducing various mutations. By using multiple sequence

alignment and 3D structure modeling comparing to known plant TIR domains, it was shown that AtTX11/12 possess additional 6th  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ F) in addition to shared 5  $\beta$ -sheets ( $\beta$ A~ $\beta$ E) and 5  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ A~ $\alpha$ E) among plant TIRs. C-terminal deletion analysis showed that C $\Delta$ 3 containing 1~173 amino acids (a.a.) with intact  $\alpha$ E maintained the activity whereas C $\Delta$ 4 (1~163 a.a.) with truncated  $\alpha$ E lacking 5a.a. located in  $\alpha$ E lost the activity. These results indicate that the conserved 5  $\beta$ -sheets and 5  $\alpha$ -helices are essential for the growth inhibition activity of AtTX12.

By using site-directed mutagenesis it was confirmed that the conserved 24th serine and 25th histidine (AtTX12) present in AE ( $\alpha$ A- $\alpha$ E) interface are essential for growth inhibition activity whereas the lysine-rich region present in C-terminal  $\alpha$ F region is not. Furthermore, random point mutation study showed that 43th glutamate (AtTX11) present in BB ( $\beta$ B- $\alpha$ B)-loop and 150th lysine localized in  $\beta$ E composing putative BE (BB loop- $\beta$ E) interface are essential for the activity. In addition, the 79th glutamate (AtTX11), a conserved putative NADase active site was also required for the growth inhibition activity. These results showed that the interactions through AE/BE interfaces and NADase activity are required for the function of AtTX11/12.

Three *AtTX12-like* genes were polymerase chain reaction amplified using genomic DNA isolated from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), and white radish (*Raphanus sativus*), cloned and named *BoiTX12*, *BobTX12* and *RsTX12*, respectively.

Although the amino acid sequences of *BoiTX12*, *BobTX12* and *RsTX12* exhibited 65.2%, 65.2%, and 56.3% identity with that of *AtTX12*, the overexpression of *RsTX12* induced strong growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings whereas those of *BoiTX12* and *BobTX12* did not.

To screen for the essential region and amino acids for the temperature-insensitive growth inhibition activity of *AtTX11/12*, the transgenic seedlings overexpressing various mutants active at 22°C were moved and grown at 28°C to examine the growth inhibition activity. CΔ3 of *AtTX12* (1~173 a.a.) lost the growth inhibition activity at 28°C whereas CΔ1 (1~193 a.a.) and CΔ2 (1~183 a.a.) maintained the activity. In addition, N36D (*AtTX12*) active at 22°C lost the activity at 28°C. These results suggest that the C-terminal 174~183 a.a. region present between αE and αF of *AtTX12* and 36th Asn present at βB would be essential for the temperature-insensitive growth-inhibition activity of *AtTX12*. To examine whether the *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1)* is required for such temperature-insensitive growth inhibition activity, *eds1-2 Q2610>>AtTX12* seedlings showing much weaker growth inhibition phenotypes compared with *Q2610>>AtTX12* seedlings were grown both at 22°C and 28°C conditions where they show no difference in growth. These results suggest that the growth inhibition activity of *AtTX12* might be mediated by 1) *EDS1*-dependent pathway and 2) *EDS1*-independent temperature-insensitive pathway. Therefore *eds1-2 Q2610>>AtTX12* could be used as a proper genetic background for the novel growth-inhibition or disease-resistance pathway.

## 국문초록

애기장대의 Toll/interleukin-1 receptor 영역을

암호화하는 *AtTX11/12* 유전자의 기능적인 분석

임수민

지도교수 : 송상기

글로벌바이오융합학과

조선대학교 대학원

식물은 다양한 유형의 저항성 (R) 단백질을 활용하여 병원체의 공격으로부터 자신을 방어한다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 유전체에는 비표준적인 R 단백질인 Toll-interleukin-1 receptor only 단백질(TX)을 암호화하는 30 개의 유전자들이 존재하지만 일부 TX 들만의 기능이 밝혀진 바 있다. *AtTX11/12*의 과대발현(*Q2610>>AtTX11/12*)은 형질전환된 애기장대의 극심한 성장저해를 유도하였으며, 특히 고온 조건에서도 이러한 성장저해 활성은 유지되었다. 본 연구를 통해서 *AtTX11/12*에 다양한 돌연변이를 도입하여 성장저해능과 고온-비민감성 활성에 필수적인 *AtTX11/12*의 영역과 필수적인 아미노산들을 선별하고자 하였다. 다중서열정렬 프로그램과 3 차원 구조 예측 프로그램을

활용하여 AtTX12 와 구조가 밝혀진 식물 TIR 도메인의 아미노산 서열을 비교 분석한 결과, AtTX11/12 에는 식물 TIR 도메인에 공통적으로 존재하는 보존된 5 개의  $\beta$ -sheet ( $\beta A \sim \beta E$ )들과 5 개의  $\alpha$ -helix ( $\alpha A \sim \alpha E$ )들 외에도 추가적인 6 번째  $\alpha$ -helix ( $\alpha F$ )가 존재하는 것이 확인되었다. AtTX12 의 C-말단 결실 돌연변이들을 제조하여 발현시킨 결과, C-말단 30 개의 아미노산이 결실된 돌연변이[C $\Delta$ 3, 1~173 amino acid (a.a.)]까지는 성장저해능이 유지되었지만  $\alpha E$  구조에서 5 개의 아미노산이 결실된 돌연변이(C $\Delta$ 4, 1~163 a.a.)부터는 성장저해능이 완전히 소실되었다. 이 결과는 AtTX12 가 성장저해능을 발휘하기 위해서는 식물 TIR 도메인에 보존된 5 개의  $\beta$ -sheet 들과 5 개의  $\alpha$ -helix 들이 필수적이며, 추가적인  $\alpha F$  는 성장저해능에 필수적이지 않다는 것을 의미한다.

위치 유도 돌연변이의 연구를 통해서 식물 TIR 도메인의 상호작용에 핵심적인 AE ( $\alpha A - \alpha E$ ) interface 상에 보존된 24 번 세린과 25 번 히스티딘(AtTX12)은 성장저해 활성화에 필수적인 반면, C-말단의  $\alpha F$  상에 위치한 라이신 풍부 지역은 필수적이지 않다는 것을 확인하였다. 또한 무작위적 돌연변이를 AtTX11/12 에 도입하여 활성을 조사한 결과, 잠정적인 TIR 도메인 상호작용 장소인 BE (BB loop- $\beta E$ ) interface 를 구성하는 BB ( $\beta B - \alpha B$ )-loop 상의 43 번 글루탐산(AtTX11)과  $\beta E$  상에 위치하는 150 번 라이신(AtTX12)이 성장저해 활성화에 필수적이라는 것을 확인하였다. 그리고 잠정적인 NADase 활성화 장소로써 보존된 79 번 글루탐산(AtTX11)도 성장저해 활성화에 필수적이었다. 이러한 결과는 AtTX11/12 의 성장저해 활성화는 유사한 식물 TIR 들과 마찬가지로 AE/BE interface 를 통한 상호작용과 NADase 활성화에 의존적인 것을 의미한다.

배추과의 세 작물, 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*), 콜리플라워(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)와 무(*Raphanus sativus*)에서 AtTX12 유사

유전자를 PCR 증폭하여 클로닝하였다. 이들을 각각 *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12* 라고 명명하였고 이들이 암호화하는 아미노산 서열은 AtTX12 와 각각 65.2%, 65.2%, 그리고 56.3%의 동질성을 나타냈다. 애기장대에서 *BoiTX12* 와 *BobTX12* 의 과발현은 성장저해능을 유도하지 못했지만, *RsTX12* 의 과발현은 성장저해 활성을 나타냈다.

AtTX11/12 의 고온 비민감성 성장저해능에 필수적인 영역과 아미노산을 선별하기 위해서, 22°C 조건에서 성장저해능을 나타냈던 돌연변이 과발현 형질전환체들을 28°C 조건에서 배양하여 성장저해능을 조사하였다. 그 결과 AtTX12 의 C $\Delta$ 1 (1~193 a.a.)과 C $\Delta$ 2 (1~183 a.a.)는 고온 조건에서도 성장저해능을 유지한 반면, C $\Delta$ 3 (1~173 a.a.)는 고온 조건에서 성장저해능이 소실되었다. 또한, 22°C 조건에서 성장저해능을 나타냈던 N36D (AtTX12) 돌연변이의 경우 고온 조건에서 활성을 소실하였다. 따라서 AtTX12 가 고온 비민감성 성장저해능을 유지하기 위해서는 C-말단의  $\alpha$ E 와  $\alpha$ F 사이에 존재하는 174~183 a.a.의 영역이 필수적이며,  $\beta$ B 상의 36 번째 아스파라긴이 필수적이라는 것이 확인되었다. 한편, AtTX12 에 의한 고온 비민감성 성장저해능이 *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1)* 의존적인지 확인하고자 야생형 배경의 *Q2610*>>*AtTX12* 비해서 성장저해능이 크게 약화된 *eds1-2 Q2610*>>*AtTX12* 유식물을 22°C 및 28°C 조건에서 배양한 결과 이들은 두 조건에서 서로 대등한 성장저해 표현형을 나타냈다. 이러한 결과는 *AtTX12* 에 의한 성장저해능은 1) *EDS1*-의존적 경로와 2) *EDS1*-비의존적 고온-비민감성 경로에 의해서 전달된다는 것을 제시한다. 따라서 *eds1-2 Q2610*>>*AtTX12* 과발현체 배경은 새로운 성장저해능 또는 병저항성 경로를 선별하기에 적합한 유전학적 배경으로 활용될 수 있다.

## I. 서론

식물은 고착생물이기 때문에 식물의 생장은 가뭄이나 저온 같은 비생물학적 스트레스 요인뿐만 아니라 병원체 같은 생물학적 스트레스 요인에 의해서도 큰 영향을 받는다. 병원체들에 대한 식물체의 저항성은 식물 세포 내에서 항시적으로 존재하는 물질이나 유도성 물질에 의해서 발생하는 다양한 방어 기작들을 통해서 조절된다(Torres et al., 2006). 선천성 면역 체계와 후천성 면역 체계를 모두 사용하는 척추동물과는 달리 순환계와 면역 세포가 결여된 식물은 주로 두 계층의 선천성 면역 반응에 의존하여 방어 반응을 수행한다. Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)를 감지하는 pattern recognition receptors (PRRs)는 PAMP-triggered immunity (PTI)라고 하는 식물의 1차 방어 기작을 유도한다. 식물이 감지하는 대표적인 PAMP에는 운동성 세균의 flagellin (Felix et al., 1999)과 elongation factor thermo unstable (EF-Tu)같은 원핵생물에서 가장 풍부하고 고도로 보존된 단백질이 속한다(Kunze et al., 2004).

성공적인 독성 병원체는 effector 단백질을 식물 세포에 전달하여 식물의 PTI를 교란하여 감염을 촉진할 수 있다(Jones and Dangl, 2006). 한편, 식물은 이러한 병원체의 공격으로부터 자신을 보호하기 위해 독성 병원체의 effector 단백질을 인식하는 세포 내부의 저항성 단백질을 활용하여 effector-매개 질병 감수성을 effector-triggered immunity (ETI)로 전환함으로써 식물의 강력한 2차 방어 기작이 유도된다.

## 1. 식물의 저항성 유전자

저항성(resistance, R) 단백질은 식물의 다양한 유전자에 의해 암호화된다. 대부분의 저항성 단백질은 nucleotide binding (NB) 도메인과 leucine rich repeat (LRR) 도메인으로 구성되어 있기 때문에 NLR 단백질이라고 부른다. 이 중 NB 도메인은 ATP 결합 단백질들에 의한 뉴클레오티드 결합에 필수적인 3개의 보존된 펩티드 모티프들을 포함하고 있다(Tameling et al., 2002). 또한 NB 도메인은 포유류의 nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors에도 존재하며 선천성 면역 반응과 세포자살의 조절자 역할을 수행한다고 알려져 있다(Inohara et al., 2005). 병원성 인자가 존재하지 않을 경우, 일반적으로 NLR은 보존된 NB 도메인에 의해 매개되는 ‘off state’ 를 유지한다. NB 도메인 상에 도입된 돌연변이들은 보존된 phosphate-binding loop (P-loop) 또는 methionine-histidine-aspartate (MHD) 모티프들에서의 기능 소실을 초래하거나 성장저해능을 발생시킬 수 있다(Bendahmane et al., 2002; Williams et al., 2011). NB 도메인이 adenosine diphosphate (ADP)와 결합하는 경우, 신호 전달을 막는 폐쇄 구조를 형성하는 것으로 예상된다. 한편, 병원체를 인식한 경우에는 ADP를 대신하여 adenosine triphosphate (ATP)가 NB 도메인에 결합하여, NLR의 신호 전달을 허용하는 ‘on state’ 로 전환된다. 이 모델에 대한 증거로 아마(*Linum usitatissimum*)에서 녹병(*Melampsora lini*) 저항성을 부여하는 M 단백질에 대한 연구에서 제안된 바 있다(Williams et al., 2011). 이 때, M 단백질의 성장저해능은 NB 도메인의 MHD 모티프의 돌연변이로 인해 유발된 ATP의 우선적 결합에 의해서 유도되는 것으로 나타났다. 이와 같이 NLR 단백질은 병원체의 effector 단백질을 인식하면 ATP 의존적인 형태 변화를 일으켜 국소적인 자가 세포사멸을 유도한다(Dodds and Rathjen, 2010; Qi and

Innes, 2013).

## 2. 저항성 단백질들의 올리고머화

NLR 단백질의 N-말단에는 Coiled coil (CC) 또는 Toll/Interleukin-1 receptor like (TIR) 도메인이 위치하여 각각 CNLs 또는 TNLs로 분류된다. 동물의 Toll-like receptor (TLR)의 경우, 세포 외부의 LRR 영역에 의해서 PAMP를 인식하면 세포질 내부에 위치한 TIR 도메인의 동형-이량체화가 유도된다(Tapping, 2009). 현재 N-말단의 CC 또는 TIR 도메인이 주로 신호 전달 및 올리고머화 요소로 작용한다고 제안된다. 예를 들어 보리의 polymorphic barley mildew A10 (MLA10) resistance 단백질의 CC 도메인은 동형-이량체를 형성하고 세포사멸을 일으키기에 충분하다(Maekawa et al., 2011). 아마의 L6 resistance 단백질의 TIR 도메인은 자가결합하여 동형-이량체를 형성할 수 있다(Bernoux et al., 2011). 또한 이형-이량체를 형성하는 NLR들도 보고된 바 있는데, 예를 들어 애기장대의 두 NLR인 *Recognition of Ralstonia solanacearum 1* (RRS1)과 *Resistance to Pseudomonas syringae 4* (RPS4)의 TIR 도메인들은 이형-이량체를 형성할 수 있다. 이처럼 이량체를 형성하는 L6 또는 RPS4 TIR 도메인의 과발현은 세포사멸을 유발하기에 충분하다(Swidorski et al., 2009; Bernoux et al., 2011). 식물 NLR의 CC 또는 TIR 도메인의 올리고머화는 hypersensitive response (HR)이라고 부르는 국소적 세포사멸을 초래하며 면역 반응을 일으키기에 충분하다. 그렇지만 자가결합과 올리고머화에 의한 NLR 단백질 활성화 이후의 하류 신호 전달 경로는 여전히 불명확하다(Casey et al., 2016; Wang et al., 2019).

### 3. 비표준적인 TNL

애기장대 Col-0 생태형의 유전체에서 모두 145개의 TIR 도메인을 암호화하는 추정 유전자를 식별하였다. 이 중에서 92개의 유전자는 TNL을 암호화하고, 23개의 유전자는 LRR 도메인이 없는 TIR-NB (TN)를 암호화한다. 최근에 TN의 병저항성 기능이 연구된 바 있는데, TN2는 *exo70B1* 돌연변이에서 활성화된 방어 반응에 필수적으로 요구된다(Zhao et al., 2015). 마지막으로 30개의 유전자는 NB 도메인과 LRR 도메인 모두 없는 TIR 도메인만을 암호화한다(Meyers et al., 2002). TIR 도메인만을 암호화하는 유전자를 *TIR-X (TX)* 또는 *TIR-only* 유전자라고 하며, 본 연구에 사용된 *AtTX11/12* 유전자는 *Response to HopBA1 (RBA1)*, *AtTX14* 등과 함께 *TX* 유전자군에 해당한다.

### 4. TNL 하류에서 작용하는 두 종류의 식물 면역 신호 경로

유전자 스크리닝을 통해서 식물 TIR 활성화 이후의 면역 반응 과정에 보편적으로 필요한 것으로 보이는 두 가지 단백질 family들이 검증되었다. 첫 번째는 lipase-like 단백질인 ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) family이다. EDS1 family는 EDS1, SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101 (SAG101), PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4)로 구성되어 있다(Feys et al., 2005; Lapin et al., 2019). 두 번째 단백질 family는 EDS1 family의 하류에서 기능한다고 알려진 ‘RNL’ 이라고 불리는 ‘helper’ CNL들인 Resistance to powdery mildew 8 (RPW8) class이다(Peart et al., 2005; Qi et al., 2018; Jubic et al., 2019; Wu et al., 2019). 또한, N-requirement gene 1 (NRG1)과 Activated Disease Resistance 1 (ADR1) family와 같은 ‘helper’ NLR들은 TIR 면역 신호 전달 경로에서 EDS1

family 하류에서 면역 반응을 매개하는 것으로 보인다(Collier et al., 2011; Qi et al., 2018; Jubic et al., 2019).

EDS1은 PAD4 또는 SAG101과 이형-이량체를 형성하여 TIR 면역 신호를 전달한다(Feys et al., 2005; Wagner et al., 2013). EDS1과 PAD4는 살리실산 신호 전달 및 식물 기초 방어에서 기능한다고 보고되었다(Cui et al., 2017). EDS1-SAG101 이형-이량체는 N-말단 lipase-like 도메인의 결합과 C-말단의 고도로 보존된 EDS1-PAD4 도메인이 상호작용을 하며 구조를 형성한다(Wagner et al., 2013). TNL인 RPS4와 특정 TN 단백질은 NRG1과 마찬가지로 EDS1과 관련이 있는 것으로 보고되었다(Heidrich et al., 2011; Nandety et al., 2013; Huh et al., 2017; Qi et al., 2018). *eds1* null 배경에서도 ADR1 또는 NRG1의 RPW8 도메인의 과발현은 HR을 유발하기에 충분한 것으로 볼 때, ADR1과 NRG1은 TIR 면역 신호 전달 경로에서 EDS1 family의 하류 매개자라고 볼 수 있다(Collier et al., 2011; Qi et al., 2018).

## 5. 식물의 TIR 신호 전달 과정에서 NADase 활성의 중요성

동물에서 TIR-TIR 상호작용은 스캐폴드를 형성함으로써 면역 신호 전달을 촉진한다고 알려져 있지만, 식물에서는 TIR 기능의 새로운 패러다임이 등장했다. 즉, 식물 TIR 도메인이 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)가수분해 효소(NADase)로 작용한다고 최근에 보고되었다(Horsefield et al., 2019). 동물에서 Toll-like receptor 2의 TIR 도메인 결정 구조는 TIR-TIR 상호작용에 필요한 아미노산 잔기와  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet와 같은 TIR 도메인의 핵심 구조를 보여주었다(Xu et al., 2000). 동물 TIR 스캐폴딩은 염증 반응 및 사이토카인 생성과 같은 다양한 방어 반응을 유도할 수 있다. 이와는 대조적으로 특이한 동물 TIR 단백질인 *sterile alpha and TIR motif-*

*containing 1* (SARM1)은 programmed cell death 활성화 과정인 축삭 변성에서 기능하며(Gerdt et al., 2015), 놀라운 효소 기능을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Essuman et al., 2017). SARM1에 의한  $NAD^+$  가수분해는 ADP-ribose (ADPR), cyclic-ADPR (c-ADPR) 및 nicotinamide (NAM)을 생성하고 결과적으로  $NAD^+$ 를 고갈시켜서 세포사멸을 촉진한다(Essuman et al., 2017). SARM1 TIR의 결정 구조는 식물 및 원핵생물 TIR 도메인에서도 보존되어 있으며, SARM1 TIR NADase 기능은 올리고머화 및 TIR-TIR 상호작용에 의존적이다(Horsefield et al., 2019). SARM TIR 도메인의 활성화 부위에는  $NAD^+$  가수분해에 필요한 글루탐산(E642)이 보존되어 있었고, 이 글루탐산은 촉매제로 작용하는 것으로 추정된다(Horsefield et al., 2019). 놀랍게도 동물에서 유래한 SARM1을 *Nicotiana benthamiana*의 잎에서 일시적으로 발현시켰을 경우 식물 세포의 사멸이 유발되었다(Horsefield et al., 2019). SARM1에 의해 유발되는 식물 세포사멸은 축삭 변성처럼 NADase 기능을 필요로 했지만, EDS1과 NRG1에 의존적인 식물 TIR 신호 전달과 달리 EDS1과 NRG1에 비의존적으로 진행되었다(Horsefield et al., 2019; Wan et al., 2019).

동물의 SARM1과 유사하게 식물의 TIR 또한 NADase로 작용하며, NADase 활성화는 면역 신호를 전달하는 데 필요하다고 보고되었다(Horsefield et al., 2019) SARM1 TIR과 유사하게 식물의 TIR 도메인은  $NAD^+$  및  $NADP^+$ 를 기질로 사용할 수 있지만  $NAD^+$  전구체인 nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD)는 사용할 수 없었다(Essuman et al., 2018; Horsefield et al., 2019). 식물의 TIR은 NADase 반응을 통해서 NAM, ADPR 및 variant of cyclic ADPR (v-cADPR)을 생성한다. SARM1 TIR과 달리 식물 TIR의 효소 활성화에 의해서 c-ADPR은 생성되지 않았다(Essuman et al., 2018).

## 6. TIR의 활성화에 요구되는 TIR 상호작용 접속면

식물 TIR-TIR 자가결합은 alpha helix 쌍으로 형성된 2개 이상의 interface들을 통해서 발생한다.  $\alpha$ -helix A와  $\alpha$ -helix E 사이의 접속면(AE interface) 및  $\alpha$ -helix D와  $\alpha$ -helix E 사이의 접속면(DE interface)은 TIR-TIR 자가결합 및 HR의 활성화에 필요하다. DE interface는 아마의 L6 TIR 도메인 결정 구조에 의해 최초로 밝혀졌다(Bernoux et al., 2011). RRS1과 RPS4 이형-이량체의 결정 구조에서 AE interface가 확인되었으며, resistance to *Peronospora parasitica* 1(RPP1)에서도 AE 및 DE interface의 존재가 확인되었다(Williams et al., 2014; Zhang et al., 2017). TIR-only protein인 RBA1은 AE interface와 DE interface 모두를 사용하여 자가결합한다고 보고되었다. RBA1 자가결합은 yeast two-hybrid assay 또는 co-immunoprecipitation을 통해 확인되었으며, AE 및 DE interface들은 세포사멸을 유발하기 위해서 모두 유지되어야 한다. RBA1과 유사한 resistance to *Plasmopara viticola* 1(RPV1) TNL에서 분리된 TIR 도메인은 HR을 활성화하기에 충분하였으며(Williams et al., 2016), AE interface가 파괴되었을 경우 RPV1에 의해서 매개된 HR은 불활성화되었다(Williams et al., 2016). 따라서 TIR-TIR interface는 TIR에 의해서 매개된 면역 반응에 필수적인 것으로 보인다. 위의 결과들을 종합해 보면, 식물의 TIR이 세포사멸 활성화 및 질병 저항성을 갖기 위해서는 NADase 기능이 필요하고, TIR의 NADase 활성화에는 AE 및 DE interface를 통한 자가결합 과정이 필요하다고 정리할 수 있다(Horsefield et al., 2019).

한편, 식물 TIR의 NADase 활성화와 AE 및 DE interface의 상호작용은 공통적으로 TNL 및 TIR 도메인의 고차원적인 올리고머화에 의존하는 것으로 보인다. 흥미롭게도 RPP1의 결정 구조 분석을 통해서 효소 활성 자리의 글루탐산을 덮는

BB-loop ( $\beta$ -sheet B와  $\alpha$ -helix B 사이의 아미노산 서열)가 TIR 도메인 사이에서 새로운 유형의 상호작용에 관여한다고 제시되었다(Bayless and Nishimura, 2020). 또한 최근에 cryo-electron microscopy를 통한 ROQ1 (Recognition of XopQ1)-XopQ (*Xanthomonas* outer protein Q) resistosome complex의 구조 연구에서, AE-AE 상호작용에 관여하는 TIR 도메인들의 이량체화 과정에서 BB loop와 인접한 DE interface 사이에서도 BE interface가 형성된다는 것이 보고되었다. BB-loop상의 돌연변이와 DE interface 상의 아미노산에 도입된 돌연변이들이 각각 독립적으로 HR의 소실을 초래한다는 것이 밝혀졌다(Vyncke et al., 2016; Horsefield et al., 2019; Martin et al., 2020).

## 7. 온도가 TIR의 활성화에 미치는 영향

온도는 식물의 생리적 특성에 큰 영향을 미치며 특히 식물의 선천성 면역 반응이 정상적으로 진행되기 위해서는 적절한 온도 조건이 필수적이다. 칼슘-의존성 막 단백질인 copine을 암호화하는 *BONZAI1*의 기능상실 돌연변이(*bon1-1*) 배경에서 TNL을 암호화하는 *suppressor of npr1-1, constitutive1 (SNCI)*은 높은 수준으로 발현되며 그 결과 22°C에서 왜소한 표현형을 나타내지만, 28°C에서는 야생형과 유사한 표현형을 나타냈다. 실제로 28°C 조건에서 *bon1-1* 배경의 *SNCI*의 전사 수준은 22°C 조건에 비해서 크게 감소하였으며, *bon1-1*의 왜생형 표현형은 EDS1에 의존적이었다(Yang and Hua, 2004). 또한 TNL이 매개하는 식물의 선천성 방어와 살리실산 신호 전달에 관여한다고 알려져 있는 *EDS1* 및 *PAD4* 전사물의 축적은 고온에 의해 억제된다고 보고된 바 있다(Zhang et al., 2003; Yang and Hua, 2004). 반면에 *TX* 유전자군에 속하는 *AtTX14*를 과발현하는 식물에서는 22°C와 28°C

조건에서 공통적으로 방어 관련 유전자의 발현이 유도되었으며, 그 결과 두 조건에서 모두 왜소한 표현형을 관찰할 수 있었다(Kato et al., 2014). 또한 선행 연구를 통해서 *AtTX11/12*를 과발현하는 식물체의 경우, 저온과 고온 환경에서 모두 극단적으로 생장이 저해되는 것을 관찰한 바 있었다. 이러한 결과들을 종합하면 일반적인 식물 방어 반응의 활성화는 식물의 성장저해를 유도하지만 고온 조건에서는 방어 반응이 억제되면서 식물의 생장이 회복되는 반면, *TX*의 과발현에 의한 성장저해는 고온에서도 유지된다는 것을 시사한다.

## 8. 본 연구의 목적

본 연구에서는 *AtTX11/12*의 성장저해능과 고온 비민감성 활성화에 필수적인 영역과 핵심적인 아미노산들을 선별하고자 다양한 돌연변이 즉, C-말단 결실 돌연변이, 위치 특이적 점 돌연변이 및 무작위적인 점 돌연변이들을 *AtTX11/12*에 도입하였다. 1단계 선발과정에서는 돌연변이 *AtTX11/12*를 과발현하는 형질전환된 식물에서 성장저해 표현형의 발현 여부를 조사하였고, 2단계 선발과정에서는 성장저해능을 유지하는 형질전환된 식물들이 고온 조건에서도 성장저해능을 유지하는지 조사하였다. 그 결과 *AtTX11/12*의 성장저해능에 필수적인 최소 영역과 핵심 아미노산들을 선별하였고 고온 비민감성 활성화에 관여하는 영역과 아미노산도 확인할 수 있었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물 재료 및 생장 조건

본 연구에서는 Columbia-0 (Col-0)을 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 야생형으로 사용하였다. 애기장대의 종자를 무균상태에서 배양하기 위하여 0.7% sodium hypochlorite (Yuhan Co.; Seoul, Korea) 수용액에 5분간 표면 살균시킨 다음 파스퇴르 피펫을 사용하여 멸균된 증류수로 5회 세척하였다. 살균된 종자는 1% (w/v) sucrose, 0.6% (w/v) Gelrite (Duchefa; Haarelm, Netherlands)가 포함된 ½ Murashige and Skoog (½ MS) (Duchefa; Haarelm, Netherlands) 고형 배지에 일렬로 파종한 다음, 암조건에서 2일 동안 4°C에서 stratification 시킨 후 22°C에서 24시간 광주기 조건하에서 발아시켜 배양하였다. ½ MS 고형배지로부터 자란 유식물은 Sunshine mix #5 (Sungrow, Canada) 토양혼합물이 담긴 화분에 옮겨 심어 식물 생장상에서 22°C, 24시간 광주기 조건하에서 배양하였다.

### 2. 배지의 조성

#### 2.1 Luria broth 배지

1L 증류수에 10 g의 tryptone, 5 g의 yeast extract, 10 g의 NaCl이 혼합된 Luria broth 25 g (Duchefa; Haarelm, Netherlands)을 첨가하여 2L의 삼각 플라스크에 넣어 흔들어 녹인 후 agarose powder 15 g (1.5% w/v)을 넣은 뒤 고압멸균을 진행하였다. 60°C 항온수조로 옮겨 식혀준 후 항생제 1000x stock을 1ml 첨가 후 clean bench에서 petri dish에 20ml씩 분주하고 상온에서 굳힌 뒤 밀봉하여 4°C에 보관하였다.

다.

## 2.2 MS 배지

1L 증류수에 sucrose 10 g과 2-morpholinoethanesulfonic acid(MES) 0.2 g (Duchefa; Haarelm, Netherlands)과 MS medium powder 2.2025 g (Duchefa; Haarelm, Netherlands)을 녹인 후 1M KOH를 이용하여 pH 5.8을 맞춰주었다. Gelrite 6 g을 첨가하고 고압멸균을 진행하였고, 60℃ 항온수조로 옮겨 식혀준 후 무균 작업대에서 square dish에 50ml씩 분주하고 상온에서 굳힌 뒤 밀봉하여 4℃에 보관하였다.

## 3. 식물의 게놈 DNA 추출

시장에서 알타리무, 순백옥무, 청한무 종자(Danong Co.; Namyang, Korea)를 구매하여 파종 후 5일 된 유식물 및 시장에서 구매한 브로콜리와 콜리플라워를 작게 자른 후 액체질소를 이용하여 막자 사발에서 갈아준 뒤 10~30 mg의 가루를 1.5ml microcentrifuge tube에 넣고 액체질소에서 30초동안 냉각시켰다. Cell lysis buffer 300 $\mu$ l를 첨가 후 60℃ heat block에서 60분동안 반응시켰다. RNase A (4 mg/ml) 1.5  $\mu$ l를 넣고 혼합한 다음 37℃ 항온수조에서 30분 동안 반응시킨 후 protein precipitation buffer를 100 $\mu$ l 첨가하여 vortexing하여 상온에서 5분 방치한 다음, 10000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮겨주고 isopropanol 300 $\mu$ l를 첨가한 후 inverting하여 혼합한 다음, 10000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 제거하고 washing buffer (80% ethanol) 500 $\mu$ l를 첨가한 후 inverting하였고, 10000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 하고 상층액을 제거하였다. 한 번 더 10000 rpm에서 2분 동안 원심분리를 시행한 후 남은 ethanol을 피펫

으로 완전히 제거한 후, 20분 동안 상온에서 건조시키고 멸균된 증류수 50~100 $\mu$ l에 녹여 4°C에 보관하였다.

## 4. 식물 발현 벡터 제작

*AtTX11/12*의 돌연변이 발현 벡터를 제작하기 위하여 polymerase chain reaction(PCR)에 필요한 primer들은 Macrogen에 주문하여 합성하였다(Table 1).

### 4.1 C-말단 결실 돌연변이의 제조

*AtTX12*의 C-말단 결실 돌연변이를 제조하기 위하여 1개의 *AtTX12-CΔ1* forward primer와 *AtTX12-CΔ1~9* C-말단 결실 reverse primer를 제작하여 (Table 1) *Pyrococcus furiosus*-PCR (Pfu-PCR) (Nanohelix Co.; Daejeon, Korea)을 시행하였다. *AtTX12*의 C-말단 결실 돌연변이의 PCR 산물을 pJET1.2 cloning vector (Thermo Fisher; Carlsbad, CA, USA)에 ligation하여 삽입한 다음, 대장균 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  균주를 형질전환시켜, 단일 콜로니를 확보한 다음, 플라스미드 DNA를 추출하여 염기서열을 검정하였다.

결실 지역 외에 돌연변이가 없는 9개의 C-말단 결실 돌연변이 DNA 절편을 제한효소 Spe I 을 처리하여 분리한 다음, 동일한 제한효소로 multiple cloning sites (MCS)가 절단된 5x UAS 프로모터 영역과 FLAG-tag과 nos terminator가 포함된 pCB302 발현 벡터(5xUAS-FLAG-Tnos-pCB302)에 클로닝하였다(Figure 1).

### 4.2 위치 지정 돌연변이의 제조

*AtTX12*의 24번 세린과 25번 히스티딘의 알라닌화 돌연변이(S24A;H25A)를 제

조하기 위하여 overlap하여 primer를 제작 및 Pfu-PCR을 시행하였다. PCR 산물을 pJET1.2 cloning vector에 ligation하여 삽입한 다음, DH5  $\alpha$  균주를 형질전환시켜 단일 콜로니를 확보한 후 플라스미드 DNA를 추출하여 염기서열을 검정하였다. 24번 세린의 알라닌화와 25번 히스티딘의 알라닌화 외에는 돌연변이가 없는 DNA 절편을 제한효소 Spe I 을 처리하여 분리한 다음, 동일한 제한효소로 MCS가 절단된 5xUAS-FLAG-Tnos-pCB302 발현 벡터에 클로닝하였다(Figure 1).

### 4.3 무작위적 점 돌연변이의 제조

AtTX11과 AtTX12의 무작위적 돌연변이를 제조하기 위하여 주형 DNA를 각각 *AtTX11*과 *AtTX12*를 사용하여 *Thermus aquaticus* (Taq) PCR (Nanohelix Co.; Daejeon, Korea)을 각각 30cycle과 35cycle을 진행하였다. 무작위적으로 염기 서열의 오류를 유도하여 돌연변이를 제조하기 위해 Taq polymerase를 사용하였고, PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 ligation하여 삽입한 다음, DH5  $\alpha$  균주를 형질전환시켜 blue-white screen을 통해 단일 콜로니를 확보하고 플라스미드 DNA를 추출하여 염기서열을 검정하였다. 무작위적 돌연변이가 발생한 DNA 절편을 제한효소 Spe I 을 처리하여 분리한 다음, 동일한 제한효소로 MCS가 절단된 5xUAS-FLAG-Tnos-pCB302 발현 벡터에 클로닝하였다(Figure 2).

### 4.4 배추과 작물에서 유래한 *AtTX12* 유사 유전자들의 발현 벡터 제작

배추과의 세 작물 *Brassica oleracea* var. *italica*(브로콜리), 브로콜리의 아종인 *Brassica oleracea* var. *botrytis*(콜리플라워)와 *Raphanus sativus*(무)로부터 게놈 DNA를 추출하여 각각의 gDNA를 확보하였으며, 무는 알타리무, 순백옥무, 청한무 중,

데이트베이스상의 무 유전체 염기서열과 일치한 알타리무의 게놈 DNA를 추출하여 사용하였다. 그리고 배추과에서 유래한 브로콜리, 콜리플라워, 무의 예상되는 TIR 영역을 *BoiTX12*, *BobTX12*, *RsTX12*라고 명명하였다. *BoiTX12*, *BobTX12*, *RsTX12* 각각의 forward 및 reverse primer를 사용하여 추출한 gDNA를 주형으로 Pfu-PCR을 시행하였다. PCR 산물을 pJET1.2 cloning vector에 ligation하여 삽입한 다음 대장균 DH5  $\alpha$  균주를 형질전환시켜, 단일 콜로니를 확보한 다음 플라스미드 DNA를 추출하여 염기서열을 검정하였다. *BoiTX12*와 *BobTX12*의 DNA 절편을 제한효소 BamH I 과 Spe I 을 처리하여 분리한 다음, 동일한 제한효소로 MCS가 절단된 5xUAS-Tnos-pCB302 발현 벡터에 클로닝하였고, *RsTX12*의 DNA 절편은 제한효소 BamH I 을 처리하여 분리한 다음 동일한 제한효소로 MCS가 절단된 동일한 발현 벡터에 클로닝하였다(Figure 2).

Table 1. List of primers for PCR

construct	primer	Sequence (5' → 3' )
AtTX12-C11	Forward	GACTAGTATGACATTCTTCTCTCCCACT
	Reverse	ACTAGTAGGAAGCTCACATTTGCAATC
AtTX12-C12	Reverse	ACTAGTCTTTTTTCCCAAAATGATTCTCTT
AtTX12-C13	Reverse	ACTAGTAAGTCCAATCGTTGCTACAAC
AtTX12-C14	Reverse	ACTAGTCGCCTTAACAACCTCCTTGAT
AtTX12-C15	Reverse	ACTAGTTTCATCACTGCCAAAAAAGAAT
AtTX12-C16	Reverse	ACTAGTCATCTTGTGGGGATACATTC
AtTX12-C17	Reverse	ACTAGTTTTCCATTTCTTGATCTGATCAC
AtTX12-C18	Reverse	ACTAGTAACCTTTGCCAGCGTCCAG
AtTX12-C19	Reverse	ACTAGTAAACTCACCTGTCTGTTTTCG
AtTX12_S24H25/AA	Forward	GCTACTCCACGTCCATAAGG
AtTX12_R20H25/AA		
AtTX12_S24H25/AA	Reverse	TCAATGAGGGCGGCCACGAA
AtTX12_R20H25/AA	Reverse	GGCGCTCACGAAGCTGGCA
AtTX12_K183K184K196K197/AAAA	Forward	GACTAGTATGACATTCTTCTCTCCCACT
	Reverse	ACTAGTCAACTTTTTGGTTCTGCTTGCGGCCAAATCA GGAAGCTCACATTTGCAATCCTTTCTTGCGGCTTTCCC
AtTX11/12_Random mutation	Forward	GACTAGTATGACATTCTTCTCTCCCACT
	Reverse	TACTAGTTCACAACCTTTTTGGTTCTGCTT
BoiTX12	Forward	GGATCCATGCGAGTATTCTCT
	Reverse	ACTAGTCTAACATTTGATAATAATG
BobTX12	Forward	GGATCCATGCGAGTATTCTCT
	Reverse	ACTAGTCTAACATTTGATAATAATG
RsTX12	Forward	GGATCCATGATGATCTCATCTCCCTCC
	Reverse	GGATCCTCATTTAACAAAATCATGACTAAG

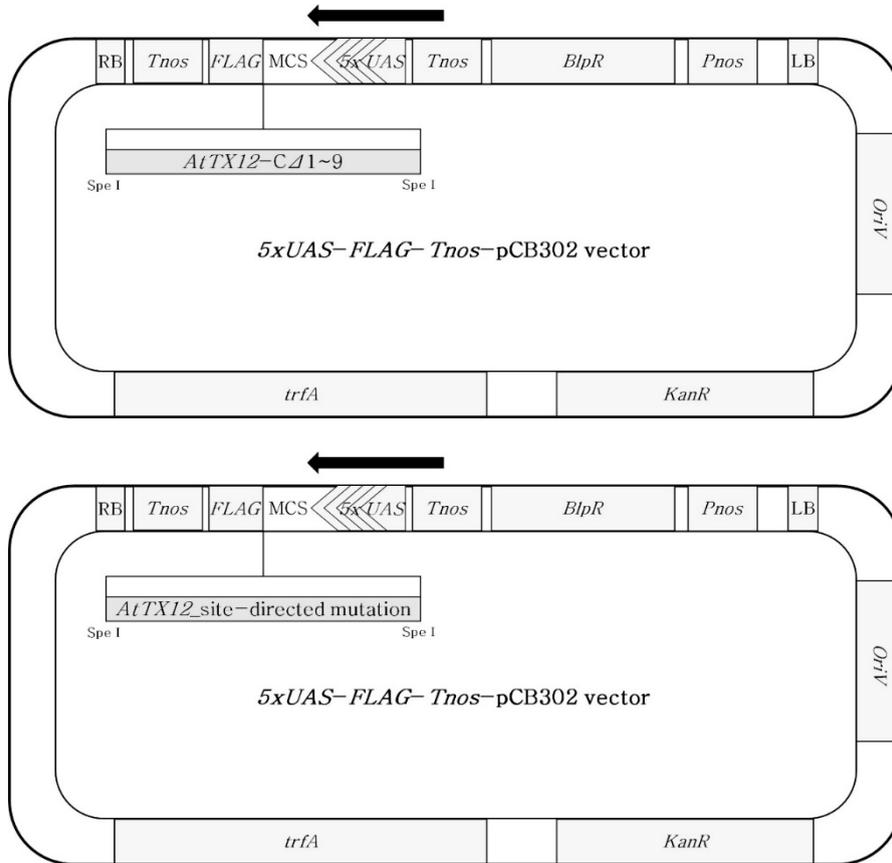


Figure 1. Diagrams of the expression vector constructs for C-terminal deletion mutants and site-directed mutants of *AtTX12* under the regulation of 5xUAS promoter.

This diagram introduced coding sequences of C-terminal deletion mutation and site-directed mutation of *AtTX12* into the 5xUAS+FLAG+Tnos+pCB302 vector. The MCS region was cleaved with Spe I. After that C-terminal deletion mutation and site-directed mutation of *AtTX12* were inserted.

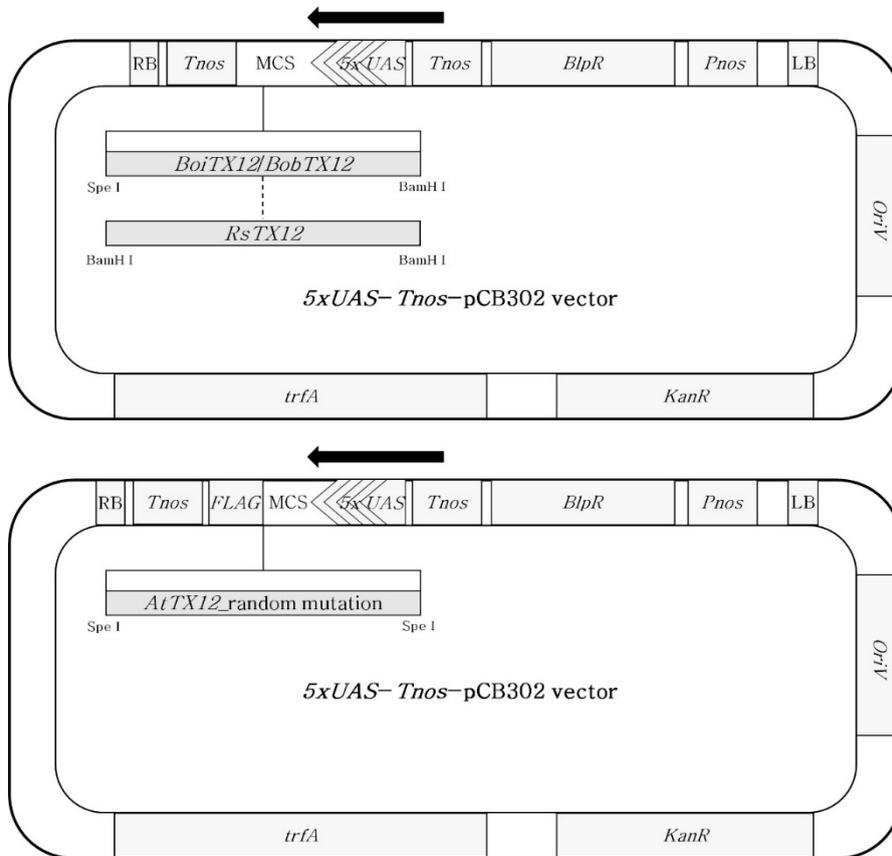


Figure 2. Diagrams of the expression vector constructs for random mutants of *AtTX11/12* and *AtTX12*-like genes originated from crops of Brassicaceae under the regulation of *5xUAS* promoter.

This diagram introduced coding sequences of random mutation of *AtTX11/12* and *AtTX12*-like gene derived from Brassicaceae into the *5xUAS+Tnos+pCB302* vector. The MCS region was cleaved with *Spe I* or *Spe I* and *BamH I* or *BamH I*. After that random mutation of *AtTX11/12* or *BoiTX12/BobTX12/RsTX12* were inserted.

## 5. 아그로박테리움을 매개로 한 애기장대의 형질전환

각각의 construct를 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain (Hofgen and Willmitzer, 1988)에 형질전환하였고, Col-0 야생형 식물에 형질전환 하기 위해서 floral dip method (Clough and Bent, 1998)를 이용하여 형질전환하였다. 형질전환체 인지 알아보기 위하여 T1 종자를 유식물상태에서 Sunshine mix #5 토양혼합물이 담긴 화분에 옮겨 심고, BASTA (glufosinate ammonium solution, Bayer crop sci.; Leverkusen, Germany)를 처리하여 형질전환된 식물임을 검증하였다.

## 6. 현미경 관찰법

애기장대의 유식물은 1/2MS 고형배지에서 배양하여 발아 후 3-5일이 경과한 다음, Leica MZ10F stereomicroscope (Leica; Wetzlar, Germany)를 사용하여 표현형을 관찰하였다. Q2610 인핸서 트랩 라인과의 교배를 통해서 과발현이 유도된 AtTX11/12 돌연변이들에 의해서, 야생형과 유사한 표현형을 나타내는 유식물들만 존재하는 경우, 먼저 Q2610에 의한 green fluorescent protein (GFP) 발현여부를 확인한 이후에 토양으로 옮겨 심어 추후에 BASTA를 처리하여 AtTX11/12 돌연변이 발현 construct가 형질전환되었는지 검정하였다. 그리고 사진 촬영은 eXcope X6 image detector module (Dixi science)을 사용하였다.

## 7. Reverse transcription (RT)-PCR 분석

야생형과 형질전환된 식물에서 다양한 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해서 발아 후 5일 동안 배양된 유식물에서 RNeasy mini kit (Qiagen; Hilden, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 biophotometer (Eppendorf;

Hamburg, Germany)를 사용하여 정량하였다. 정량한 RNA 1 $\mu$ g을 DNase I (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)처리 후 15분간 상온에서 gDNA를 분해시켰다. DNase I의 inactivation을 위해 25mM EDTA 용액을 1 $\mu$ l 첨가 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 열처리하였다. DNase I 처리를 마친 RNA의 cDNA 합성을 위하여 cDNA synthesis kit (Agilent; Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 42 $^{\circ}$ C 항온수조에서 1시간, 70 $^{\circ}$ C heatblock에서 15분 반응하여 first-strand cDNA 합성을 하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 각각의 forward, reverse primer를 사용하여 95 $^{\circ}$ C 3분 반응하고, 95 $^{\circ}$ C 30초, 54 $^{\circ}$ C 40초, 72 $^{\circ}$ C 1분동안 26회 반복 반응 후 72 $^{\circ}$ C에서 3분 반응시켰다.

*ELONGATION FACTOR1 (EF1)*은 각 유전자의 전사 수준을 일반화하기 위하여 사용되었다. 사용된 *EF1* primer는 다음과 같다. EF1-F (5' - TTGACCAGATCAACGAGCCCAAGA-3' )과 EF1-R (5' - CTCGTGGTGCATCTCAACAGACT-3' ). 그리고 *PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 (PR1)*은 다양한 병원체에 반응하여 유도되는데, 성장저해능에 유용한 분자 표지자로 사용하였다. 사용된 *PR1* primer는 다음과 같다. PR1-F (5' - GTAGGTGCTCTTGTCTTCCC-3' )과 PR1-R (5' - CACATAATTCCCACGAGGATC-3' ). 또한  *$\beta$ -1,3-GLUCANASE 2 (BGL2)*는 *PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 2 (PR2)*라고도 알려져 있으며, *PR1*과 마찬가지로 병원체에 반응하여 유도되고, 성장저해능에 유용한 분자 표지자로 사용하였다. *BGL2* primer는 다음과 같다. BGL2-F (5' -GAGCTACAGAGATGGTGTCAG-3' )과 BGL2-R (5' -ATGTAGCTGAAGTAAGGGTAG-3' ) (Kato et al., 2014).

### III. 결과

#### 1. AtTX12 는 TIR 의 자가결합 및 효소 활성화에 필수적인 보존된 아미노산들과 식물 TIR 도메인의 전형적인 3 차원적 구조를 간직하고 있다

AtTX11/12는 RBA1, AtTX14과 함께 비표준적인 TNL인 TX 유형에 속하며 TIR 도메인 외에 다른 알려진 보존된 도메인을 포함하지 않는다(Nandety et al., 2013). *AtTX11/12*, *RBA1*, 또는 *AtTX14* 유전자의 과발현은 형질전환된 식물에서 세포사멸이나 생장저해 표현형을 유도하였다(Kato et al., 2014; Song, 2016).

먼저 AtTX12에서 보존된 TIR 도메인의 위치를 확인하고, TIR 기능에 필수적인 보존된 아미노산들의 존재 여부를 확인하고자 PROSMAL3D 프로그램을 활용하여 AtTX12와 기능이 밝혀진 식물의 TIR들과 함께 아미노산 다중서열정렬(multiple sequence alignment, MSA)을 시행하였다(Figure 3). 그 결과 AtTX12에는 5개의  $\beta$ -sheet와 5개의  $\alpha$ -helix로 구성된 잘 보존된 단백질 2차 구조를 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 AtTX12에는 보존된 5개의  $\alpha$ -helix 외에도 C-말단 부근에서 추가적인 6번째  $\alpha$ -helix ( $\alpha F$ )구조가 존재하는 것을 확인하였다. 또한 AtTX12에서도 식물의 TIR 도메인에서 잘 보존된 4개의 지역이 존재하는 것을 확인하였다(Meyers et al., 2002).

식물의 TIR이 effector 없이 자가 세포사멸능 또는 생장저해능을 나타내기 위해서는 TIR 도메인 간의 이량체화 또는 다량체화를 형성해야 하며, 이 과정에서 접속면의 상호작용이 중요하다. RPS4의 동형-이량체화나 RPS4/RRS1의 이형-이량체화를

위해서는 AE interface가 중요하며 그 중에서 33번 세린과 34번 히스티딘이 필수적이다(Williams et al., 2014; Zhang et al., 2017). 또한 RBA1에서도 동등한 위치의 31번 세린과 32번 히스티딘이 자가 세포사멸능에 필수적이라고 보고되었다. MSA 결과 AtTX12의 동등한 위치에도 24번 세린과 25번 히스티딘이 존재하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3). 이는 AtTX12도 RPS4나 RBA1처럼 세린과 히스티딘에 의존적인 AE interface를 형성할 가능성이 높다는 것을 의미한다. 보존된 세린과 히스티딘은 AtTX14를 제외한 6개의 TIR 도메인에서 모두 동등한 위치에 존재하고 있었다.

한편 아마의 TIR인 L6의 TIR 도메인이 자가 세포사멸능을 발휘하기 위해서는 DE interface에서의 상호작용이 중요하며, 해당 영역의 201번 글라이신이 필수적이라고 보고되었다(Bernoux et al., 2011; Zhang et al., 2017). 또한 RBA1에서도 DE interface에 위치한 149번 라이신과 151번 글라이신이 자가 세포사멸능에 필수적이었다. AtTX12에서도 RBA1의 DE interface와 동등한 위치에 142번 라이신과 144번 글라이신이 보존된 것을 확인하였으나, AtTX14를 제외한 다른 대부분의 TNL에서는 151번 글라이신(RBA1)은 보존되었으나 149번 라이신(RBA1)은 보존되지 않았고 대신에 트레오닌, 아이소류신, 류신 등이 위치한 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

최근의 연구를 통해서 식물의 TIR들이 자가 세포사멸능을 발휘하기 위해서는 NADase 활성이 요구되며, 활성 장소에는 보존된 글루탐산이 존재한다고 보고되었다. 실제로 RPS4나 L6에 존재하는 활성 장소의 글루탐산을 알라닌으로 치환하였을 경우 모두 자가 세포사멸능이 소실되었다(Horsefield et al., 2019). AtTX12에서도 잠정적인 활성 장소와 동등한 위치에 79번 글루탐산이 존재하였다(Figure 3).

또한 AtTX12에는 다른 TIR 도메인과 구별되는 염기성 아미노산이 풍부한 영역이 183번부터 203번 아미노산에 이르는 C-말단에 영역에 존재하였다. 비록 아미노

산 서열상에는 큰 차이가 있지만, AtTX12의 추가적인  $\alpha$ F와 동등한 위치에 AtTX14와 RPP1에서도  $\alpha$ -helix 구조가 존재하였다(data not shown).

한편, AtTX12의 3차원적 구조를 예측하고자 protein homology/analogy recognition engine V 2.0 (Phyre2) 프로그램을 활용하여 AtTX12와 가장 유사하다고 알려진 RPS4 그리고 RPP1과 비교하여 모델링하였으며, RPP1과의 비교 모델링의 경우 AtTX12의 C-말단에 존재하는 추가적인 6번째  $\alpha$ -helix를 표현하였기 때문에 RPP1과 비교한 모델링의 결과를 제시하였다(Figure 4). 모델링의 결과, 내부에 평행하게 존재하는 5개의  $\beta$ -sheet를 외부의 5개의  $\alpha$ -helix가 둘러싸고 있는 전형적인 flavodoxin-like 접힘 구조를 간직하고 있었으며 추가적인  $\alpha$ F 구조가 외부로 돌출된 것을 확인할 수 있었다.

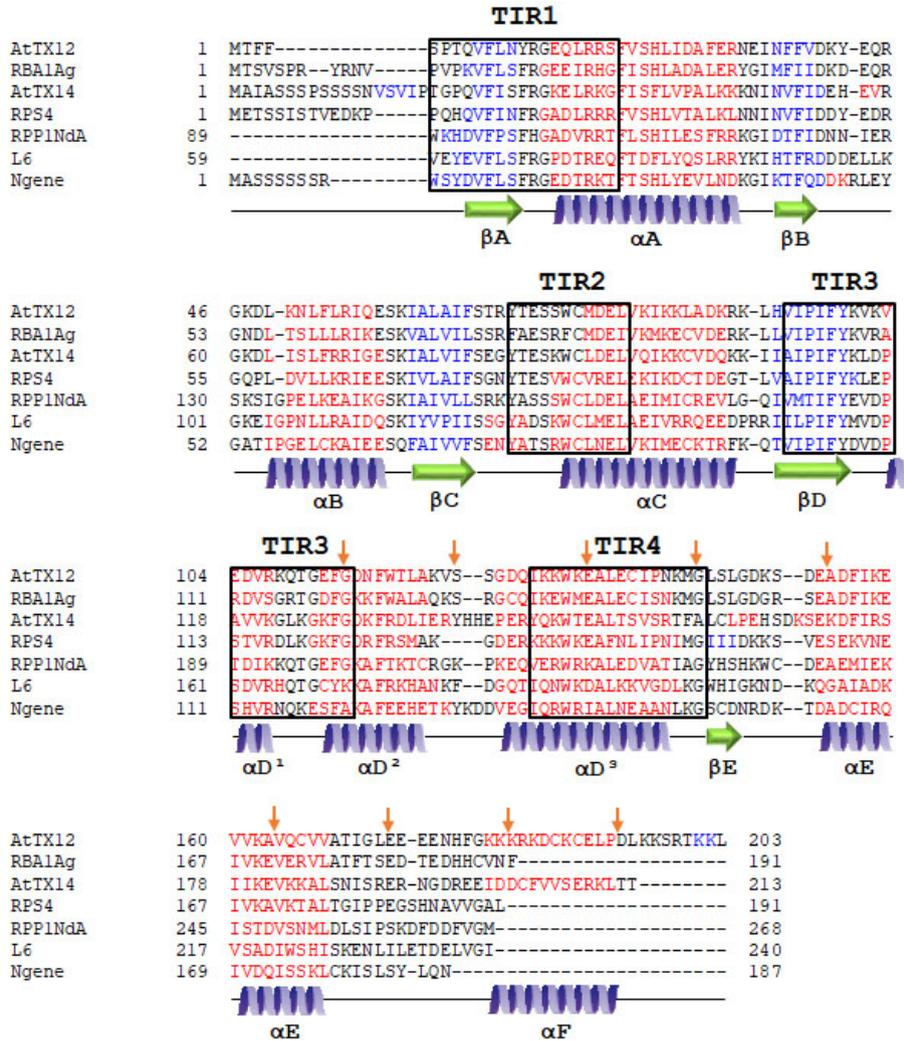


Figure 3. Multiple sequence alignment and secondary structure prediction of plant TIR domains.

This multiple sequence alignment showed the expected  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets of AtTX12 and showed the conserved TIR domains through comparison with the TIR domains of other representative TNLs (black box). The arrows indicate the C-terminal end points of C-terminal deletion mutants ( $\Delta 1 \sim \Delta 9$ ).

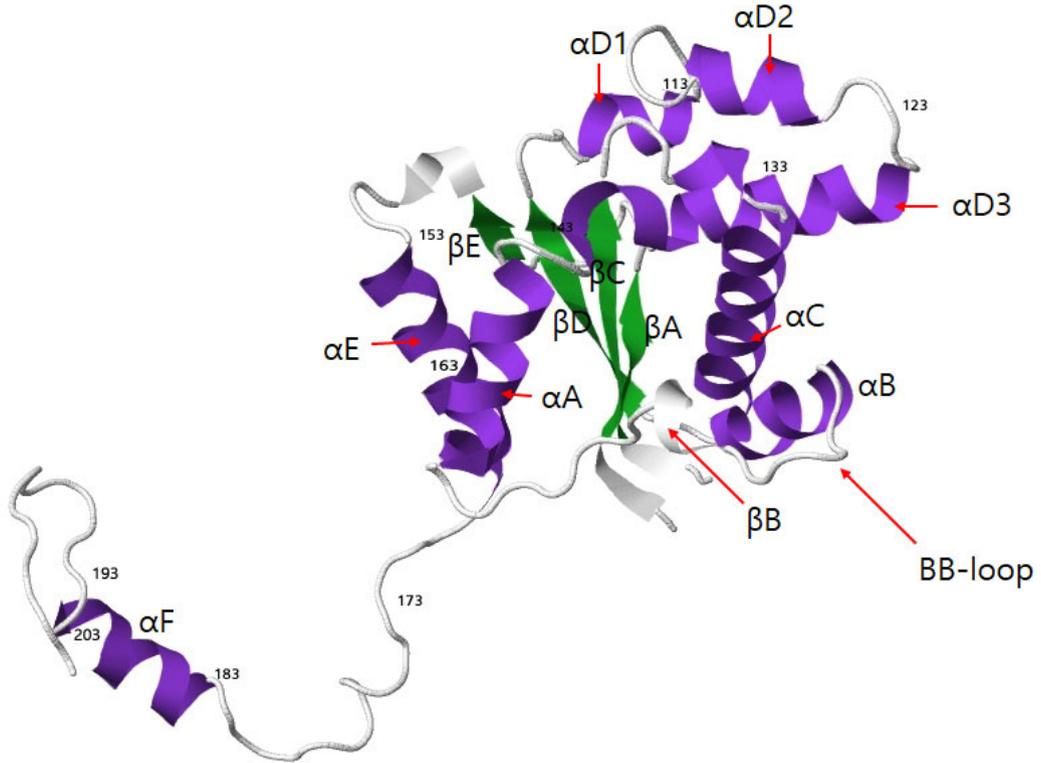


Figure 4. Structural modeling of AtTX12 using Phyre2 comparing to RPP1.

The tertiary structure of AtTX12 was predicted by using the Phyre2 program comparing to RPP1.  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets are marked in purple and green, respectively. An additional  $\alpha$ -helix was present in the C-terminal region. Each number indicates the amino acid number.

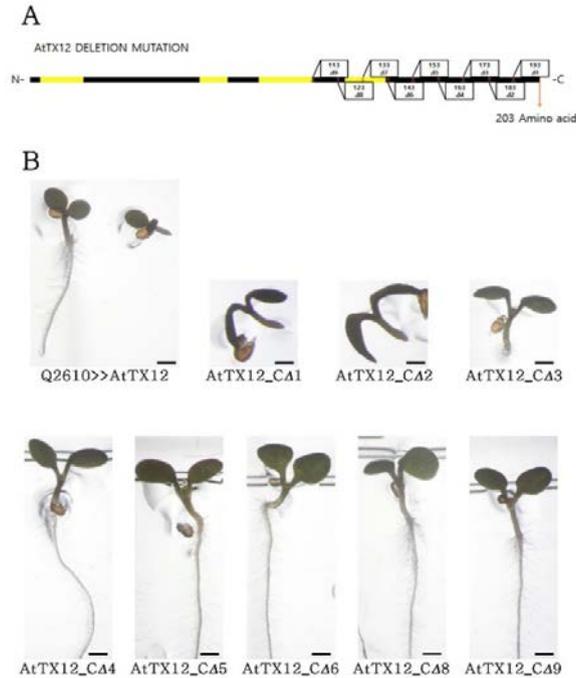
## 2. AtTX12의 성장저해능을 위해서 $\alpha E$ 의 보존이 필수적이다

애기장대의 뿌리 말단에서 강하게 발현하는 Q2610 인핸서 트랩 라인과의 교배를 통해서 UAS 프로모터의 조절을 받는 genomic *AtTX11/12*를 과발현시킬 경우, F1 유식물(*Q2610* × *gAtTX11/12*)의 뿌리는 극심한 성장저해 표현형을 나타낸 바 있었다 (Song, 2016). 본 연구에서는 같은 방식으로 203개의 아미노산을 암호화하는 *AtTX12*의 cDNA를 클로닝하여 Q2610에 의해서 발현시킨 결과(*Q2610* × *AtTX12*), F1 유식물에서 극심한 성장저해 표현형을 나타냈다.

AtTX12의 성장저해능에 필수적인 최소한의 AtTX12의 영역을 검정하고자 C-말단으로부터 10개의 아미노산 암호화 지역을 절단하여 각각 193, 183, 173, 163, 153, 143, 133, 123, 113개의 아미노산을 암호화하는 *AtTX12-C11*, *AtTX12-C12*, *AtTX12-C13*, *AtTX12-C14*, *AtTX12-C15*, *AtTX12-C16*, *AtTX12-C17*, *AtTX12-C18*, 그리고 *AtTX12-C19* 총 9개의 C-말단 결실 돌연변이 construct를 제조하였으며, 그 중 C17을 제외한 8개의 발현 construct를 애기장대에 도입하였고 (Figure 5A), Q2610과 교배하여 *AtTX12* C-말단 결실 돌연변이를 발현하는 F1 유식물의 표현형을 관찰하였다 (Figure 5B). *Q2610* × *AtTX12-C11*의 경우 총 19개의 형질전환체 라인을 준비하였고, 이 중에서 12개의 라인에서 극심한 뿌리 성장저해 표현형이 나타났다. *Q2610* × *AtTX12-C12* 형질전환체의 경우 총 12개 라인 중 6개 라인에서, *Q2610* × *AtTX12-C13* 형질전환체는 총 18개 라인 중 7개 라인에서 성장저해 표현형이 나타났다.

한편, *Q2610* × *AtTX12-C14*, *Q2610* × *AtTX12-C15*, *Q2610* × *AtTX12-C16*, *Q2610* × *AtTX12-C18*, 그리고 *Q2610* × *AtTX12-C19* 형질전환체는 각각 13, 23, 14, 14, 그리고 11개의 라인을 준비한 결과 모두 생장이 저해되지 않은 야생형 유

사 표현형을 나타냈다. 야생형 유사 표현형 유식물들은 BASTA를 처리한 후 생존여부를 확인하여, 형질전환된 식물임을 검증하였다. 대표적인 생장저해 또는 야생형 유사 표현형을 나타내는 형질전환체에서 돌연변이 *AtTX12* 유전자의 전사 수준을 알아보기 위하여 RT-PCR을 시행하였다(Figure 6). 그 결과 모든 형질전환체에서 돌연변이 *AtTX12*의 발현을 확인할 수 있었으며, 생장이 저해된 형질전환체에서는 대표적인 병저항성 유전자인 *PR1*과 *BGL2*의 발현이 상승한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *AtTX12-C11~C13*는 병저항성 유전자의 발현을 유도하는 생장저해능을 유지하고 있는 반면, *AtTX12-C14~C19*는 생장저해능이 소실되었음을 의미한다. 따라서, *AtTX12*의 생장저해 활성을 위해서는 최소한 1~173a.a.까지의 영역이 필수적이다. 흥미롭게도 *AtTX12-C14*는  $\alpha E$  구조가 일부 손상되었고, *AtTX12-C15~C19*는  $\alpha E$  구조가 소실된 것으로 볼 때  $\alpha E$ 의 보존이 *AtTX12*의 활성화에 필수적이라는 것을 의미한다.



**Figure 5.** A schematic diagram of C-terminal deletion mutants of AtTX12 and the representative phenotypes of seedlings overexpressing the C-terminal deletion mutants.

(A) A schematic diagram of C-terminal deletion mutants of AtTX12. The four highly conserved TIR regions and C-terminal deletion mutants marked in yellow bars and black boxes, respectively. (B) The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing C-terminal deletion mutants of AtTX12. Upper left panel, *Q2610>>AtTX12* (right) and WT-like sibling (left) of the F1 progenies of *UASpro:AtTX12* line crossed to *Q2610*. *Q2610>>AtTX12\_CA1~3* lines exhibited stunted growth phenotypes whereas *Q2610>>AtTX12\_CA4~9* lines displayed WT-like phenotypes. Scale bars = 0.5mm.

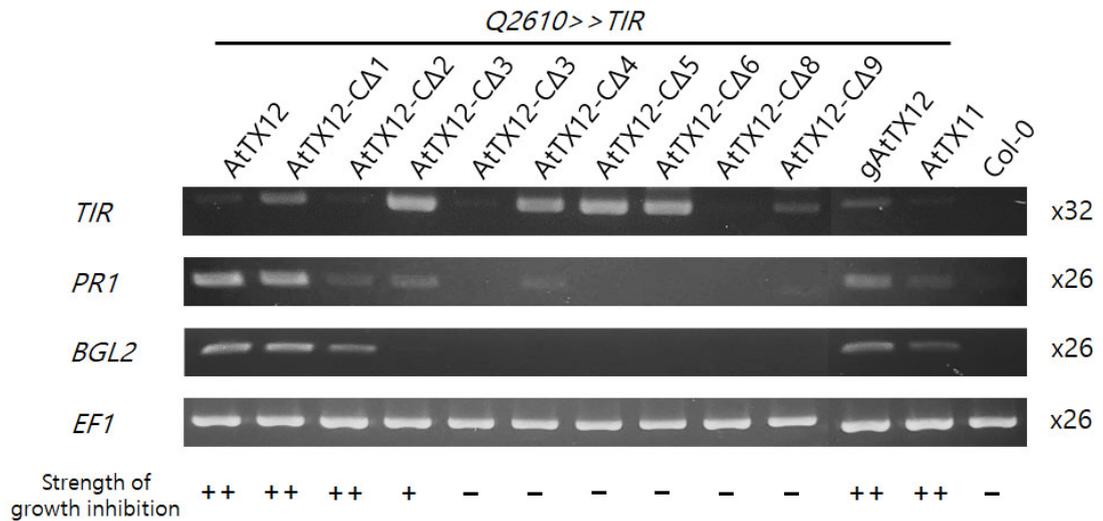


Figure 6. The overexpression of inactive C-terminal deletion mutants of AtTX12 failed to induce the expression of both *PR1* and *BGL2* in transgenic plants.

The 5-day-old transgenic seedlings were used for the extraction of the total RNA from which cDNA was synthesized and then PCR amplified with the gene-specific primers for *AtTX12*, *PR1*, *BGL2*, and *EF1* respectively (*AtTX12*, 32 cycles; *PR1*, *BGL2*, and *EF1*, 26 cycles). *TIR* indicates *AtTX11*, *AtTX12*, or *AtTX12* mutants.

### 3. *AtTX12*의 위치 지정 돌연변이와 무작위적 돌연변이 분석을 통한 생장저해능에 핵심적인 아미노산 탐색

앞선 MSA 분석을 통해 *AtTX12* 에서도 AE interface 형성에 관여할 것으로 예상되는 보존된 24 번 세린과 25 번 히스티딘이  $\alpha$ A 영역에 존재하는 것을 확인하였다. 따라서 *AtTX12* 의 생장저해 활성화에 보존된 세린과 히스티딘이 필수적인지 확인하고자 24 번 세린과 25 번 히스티딘이 각각 알라닌으로 치환된 위치 지정 돌연변이 construct (*AtTX12\_S24H25/AA*)를 제조하여 총 9 개 라인의 형질전환체를 선별하였다(Table 2). T1 식물과 Q2610 의 교배를 통하여 F1 유식물에서 *AtTX12\_S24H25/AA* 를 발현시킨 결과(Q2610>>*AtTX12\_S24H25/AA*) 9 개 라인 모두 생장이 저해되지 않은 야생형 유사 표현형을 나타냈다. 또한, TIR1 지역 내부에 보존된 20 번 아르기닌과 25 번 히스티딘을 각각 알라닌으로 치환한 *AtTX12\_R20H25/AA* 를 과발현하는 총 10 개의 Q2610>>*AtTX12\_R20H25/AA* 유식물들은 모두 야생형 유사 표현형을 나타냈다(Figure 7A,B). 야생형 유사 표현형을 나타내는 식물들은 모두 화분에 옮겨 심어 BASTA 처리 후 생존을 확인하여 형질전환된 식물임을 검증하였다. 이 결과는 보존된 25 번 히스티딘이 *AtTX12* 의 활성화에 필수적이라는 것을 의미한다.

TNL 이 기능을 수행하기 위해서 핵 내부로 수송되는 능력이 중요하다고 보고된 바 있다(Wirthmueller et al., 2007; Heidrich et al., 2011). 단백질이 핵 내부로 수송되기 위해서 nuclear localization signal(NLS)가 사용되는 경우가 많은데, NLStradamus 프로그램을 통해서 *AtTX12* 의 아미노산 서열을 탐색한 결과, C-말단에 존재하는 183 번 아미노산에서 203 번 아미노산 까지의 염기성이 풍부한 서열이 NLS 로 예측되었다(Nguyen Ba et al., 2009). 따라서 이 서열에 존재하는

183 번, 184 번, 196 번, 197 번 라이신 서열을 각각 알라닌으로 치환(K183K184K196K197/AAAA)하여 성장저해능의 소실 여부를 조사하였다. 독립적인 16 개의 *Q2610>>AtTX12\_K183K184K196K197/AAAA* 형질전환체 유식물들 중에서 13 개 라인에서 성장저해 표현형이 나타났다(Figure 7C). 이 결과는 C-말단의 염기성 아미노산이 집중되어 있는 영역은 성장저해능에 필수적이지 않다는 것을 의미한다.

TIR 의 성장저해능에 중요하다고 알려진 아미노산 외에 새로운 아미노산이 영향을 주는지 알아보기 위하여 무작위적 돌연변이를 제조하였다(Table 3). 무작위적 돌연변이 construct 를 제조하는 과정에서 오류의 빈도를 증가시키고자 의도적으로 Taq DNA polymerase 를 사용하여 PCR cycle 수를 증가시켰으며, 클로닝한 이후에 염기서열 분석을 통해서 염기서열상의 오류를 확인하였다. 이 결과, 총 30 여 종류의 *AtTX12* 돌연변이를 확보하였으며, 아미노산 서열에 변화가 없는 silent 돌연변이를 제외한 nonsense 돌연변이와 missense 돌연변이에 대한 총 8 개의 발현 construct 를 제조하였다. *Q2610>>AtTX12\_F10V* 의 경우 9 개의 형질전환체 중 7 개에서 성장저해 표현형을 나타냈으며, *Q2610>>AtTX12\_N12K*, *Q2610>>AtTX12\_N36D*, *Q2610>>AtTX12\_K60R*, *Q2610>>AtTX12\_V168A* 의 경우 각각 10, 10, 10, 17 개의 모든 라인에서 성장저해 표현형을 나타냈다(Figure 8A-E). 이 결과는 위의 4 종류의 *AtTX12* 돌연변이는 성장저해 활성이 유지되었음을 의미한다. 즉, 10 번 페닐알라닌, 12 번 아스파라긴, 36 번 아스파라긴, 60 번 라이신, 168 번 발린은 *AtTX12* 의 성장저해 활성에 필수적이지 않음을 시사한다.

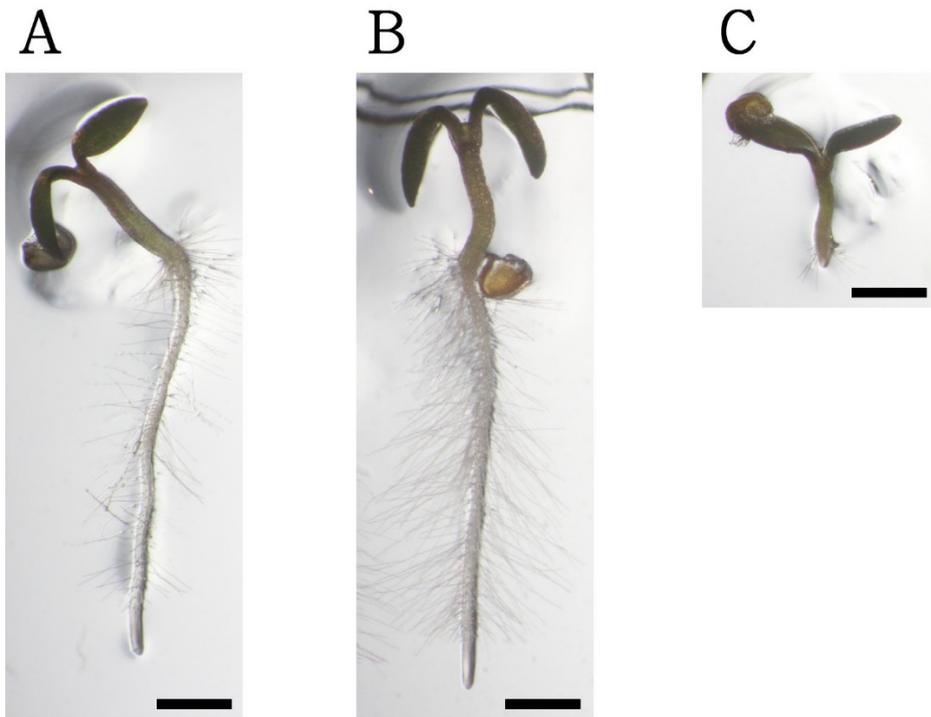
반면에 *Q2610>>AtTX12\_V101A*, *Q2610>>AtTX12\_K150S*, *Q2610>>AtTX12\_K158A*의 경우 각각 10, 12, 14 개의 모든 라인에서 성장저해능이 소실된 야생형

유사 표현형을 나타냈다(Figure 8F-H). 야생형 유사 표현형을 가진 식물은 BASTA 처리 후 생존을 확인하여 형질전환된 식물임을 검증하였다. AtTX12\_V101 $\Delta$ (1~100a.a.)와 AtTX12\_K158 $\Delta$ (1~157a.a.)는 성장저해 활성이 소실된 C-말단 결실 돌연변이인 AtTX12-C $\Delta$ 4(1~163a.a.)보다 적은 수의 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 위의 2 개의 정지 돌연변이의 활성 분석 결과는 C-말단 결실 돌연변이의 분석 결과와 상응하였다. AtTX12\_K150S 의 150 번 라이신은 다른 TIR 도메인에도 잘 보존되어 있는 아미노산은 아니었으나, 구조적으로  $\beta$ E 상에 위치하여 BE interface 형성에 영향을 줌으로써 AtTX12 의 성장저해능 유지에 요구될 수 있다.

Table 2. List of site-directed mutations introduced into *AtTX12* and their effects on growth inhibition activity of AtTX12

Position of mutation	Strength of growth inhibition
S24H25/AA	-
R20H25/AA	-
K183K184K196K197/AAAA	+

Strength of the growth inhibition was visually assessed by comparing growth inhibition and presence of root hairs between transgenic seedlings overexpressing a mutated form of *AtTX12* and the wild-type *AtTX12*. The following scoring system was used: lack of growth inhibition, -; growth inhibition similar to wild type, ++; growth inhibition weaker than wild type +; mutations showing decreased growth inhibition activity are in bold. Double or triple substitutions are separated from the original amino acid sequence by forward slash (/).



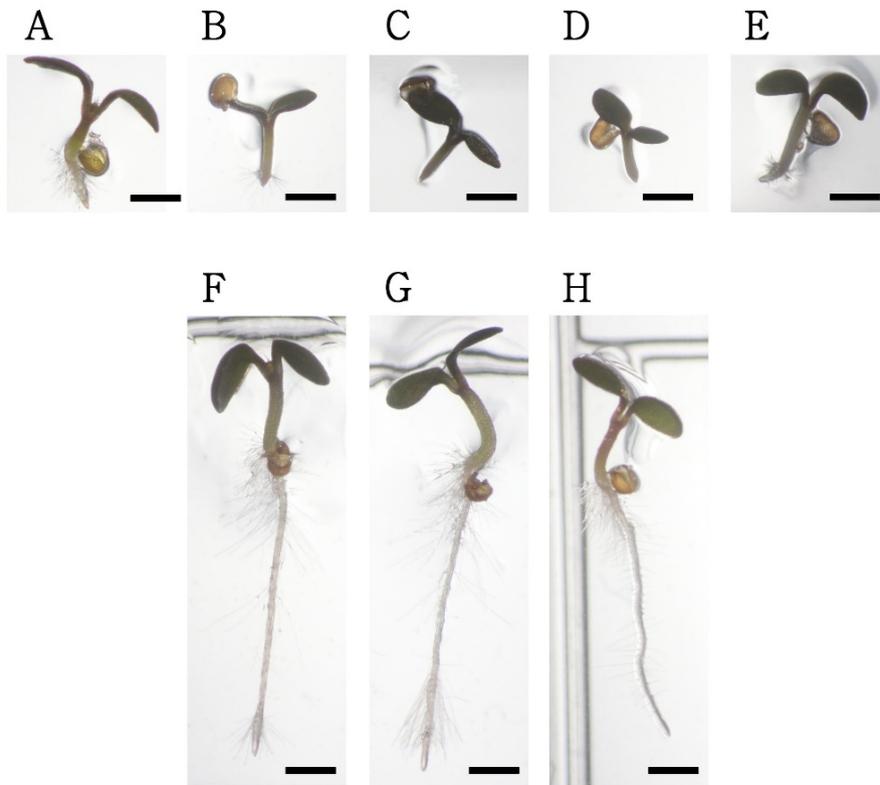
**Figure 7. The representative phenotypes of seedlings overexpressing site-directed mutants of *AtTX12*.**

The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing site-directed mutants of *AtTX12*. *Q2610>>AtTX12\_S24H25/AA* (A) and *Q2610>>AtTX12\_R20H25/AA* (B) exhibited WT-like phenotypes whereas *Q2610>>AtTX12\_K183K184K196K197/AAAA* (C) displayed stunted growth phenotype. Scale bars = 0.5mm.

Table 3. List of random mutations introduced into *AtTX12* and their effects on growth inhibition activity of AtTX12

Position of mutation		Strength of growth inhibition
AtTX12 (control)		++
AtTX12	F10V	+
AtTX12	N12K	+++
AtTX12	N36D	+++
AtTX12	K60R	+++
<b>AtTX12</b>	<b>V101</b> ↯	-
<b>AtTX12</b>	<b>K150S</b>	-
<b>AtTX12</b>	<b>K158</b> ↯	-
AtTX12	V168A	++

Strength of the growth inhibition was visually assessed by comparing growth inhibition and presence of root hairs between transgenic seedlings overexpressing a mutated form of *AtTX12* and the wild-type *AtTX12*. The following scoring system was used: lack of growth inhibition, -; growth inhibition similar to wild type, ++; growth inhibition weaker than wild type +; growth inhibition stronger than wild type +++; mutations showing decreased growth inhibition activity are in bold. ↯, nonsense mutation of amino acids.



**Figure 8. The representative phenotypes of seedlings overexpressing random mutants of *AtTX12*.**

The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing random mutants of *AtTX12*. *Q2610>>AtTX12\_F10V* (A), *Q2610>>AtTX12\_N12K* (B), *Q2610>>AtTX12\_N36D* (C), *Q2610>>AtTX12\_K60R* (D), *Q2610>>AtTX12\_V168A* (E) exhibited stunted growth phenotypes whereas *Q2610>>AtTX12\_V101Δ* (F), *Q2610>>AtTX12\_K150S* (G), *Q2610>>AtTX12\_K158Δ* (H) displayed WT-like phenotypes. Scale bars = 0.5mm.

#### 4. *AtTX11*의 무작위적 돌연변이 분석을 통한 생장저해능에 핵심적인 아미노산 탐색

*AtTX11* 과 *AtTX12* 는 각각 204 개와 203 개의 아미노산으로 구성되며, 이들은 서로 단 4 개의 아미노산 서열 차이를 간직하고 있어 98%의 동질성을 나타낸다. 즉 *AtTX12* 의 78 번 아미노산은 류신인 반면 *AtTX11* 의 경우 메티오닌, *AtTX12* 의 91 번 아미노산은 라이신인 반면 *AtTX11* 의 경우 아르기닌, *AtTX12* 의 152 번 아미노산은 아스파라긴인 반면 *AtTX11* 의 경우 세린, *AtTX12* 의 경우 174-177 번 위치에 4 개의 글루탐산이 존재하는 반면 *AtTX11* 의 경우 174-178 번 위치에 5 개의 글루탐산이 존재한다.

*AtTX12* 와 마찬가지로 *AtTX11* 의 생장저해능에 필수적인 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 Taq 에 의한 PCR 을 통해 오류를 유발하고 클로닝한 이후 염기 서열 분석을 통해 돌연변이가 발생한 염기서열을 확인하였다. 총 30 여 종류의 돌연변이를 제조하였으며, 아미노산 서열에 변화가 없는 silent 돌연변이를 제외한 9 개의 missense 돌연변이와 nonsense 돌연변이의 발현을 위한 construct 를 제조하여 F1 유식물에서 Q2610 에 의해서 발현시켰다(Table 4). *Q2610>>AtTX11\_R20C*, *Q2610>>AtTX11\_A64T*, *Q2610>>AtTX11\_L77M* 및 *Q2610>>AtTX11\_K190N* 의 경우 각각 6, 10, 7, 9 개의 모든 독립적으로 선별된 형질전환체 라인에서 생장저해능을 나타냈다(Figure 9A~D). 이 결과는 *AtTX11* 의 20 번 아르기닌, 64 번 알라닌, 77 번 류신 그리고 190 번 라이신은 *AtTX11* 의 생장저해능에 필수적이지 않다는 것을 의미하며 아미노산들은 다른 TIR 도메인에서 잘 보존되지 않았다(Figure 4).

반면에 F1 유식물에서 *Q2610>>AtTX11\_R32L49W75Y99/GPRH*, *Q2610>>AtTX11\_E43G*, *Q2610>>AtTX11\_E79G*, *Q2610>>AtTX11\_V101A*,

그리고 Q2610>>AtTX11\_K158Δ의 경우 각각 8, 13, 8, 6, 5 개의 모든 독립적으로 선별된 형질전환체 라인에서 성장저해능이 소실된 야생형 유사 표현형을 나타냈다(Figure 9E~I). 이러한 야생형 유사 표현형을 나타낸 식물들은 BASTA 처리 후 생존을 확인하여 형질전환된 식물임을 검증하였다. 이 결과는 AtTX11 에서 32 번 아르기닌, 49 번 류신, 75 번 트립토판, 99 번 티로신 중에서 적어도 1 개 이상의 아미노산, 43 번 글루탐산 그리고 79 번 글루탐산이 AtTX11 의 성장저해능에 필수적임을 의미한다. 또한 AtTX11\_V101Δ(1~100a.a.)와 AtTX11\_158Δ(1~157a.a.)는 성장저해 활성이 소실된 AtTX12-CΔ4(1~163a.a.)보다 적은 수의 아미노산들로 구성되었기 때문에 2 개의 정지 돌연변이의 활성 분석 결과는 AtTX12 의 C-말단 결실 돌연변이 분석 결과와 상응하였다.

Table 4. List of random mutations introduced into *AtTX11* and their effects on growth inhibition activity of AtTX11

Position of mutation		Strength of growth inhibition
AtTX11 (control)		++
AtTX11	R20C	++
<b>AtTX11</b>	<b>R32L49W75Y99/GPRH</b>	-
<b>AtTX11</b>	<b>E43G</b>	-
AtTX11	A64T	++
AtTX11	L77M	++
<b>AtTX11</b>	<b>E79G</b>	-
<b>AtTX11</b>	<b>V101/</b>	-
<b>AtTX11</b>	<b>K158/</b>	-
AtTX11	K190N	++

Strength of the growth inhibition was visually assessed by comparing growth inhibition and presence of root hairs between transgenic seedlings expressing a mutated form of *AtTX11* and the wild-type *AtTX11*. The following scoring system was used: lack of growth inhibition, -; growth inhibition similar to wild type, ++; growth inhibition weaker than wild type +; mutations showing decreased growth inhibition activity are in bold. Double or triple substitutions are separated from the original amino acid sequence by forward slash (/); /, nonsense mutation of amino acids.

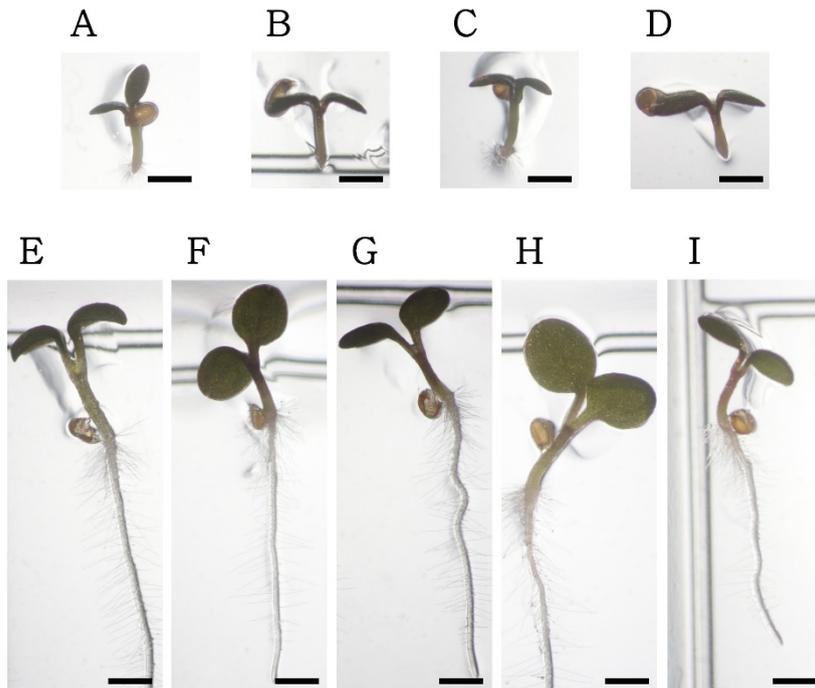


Figure 9. The representative phenotypes of seedlings overexpressing random mutants of *AtTX11*.

The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing random mutants of *AtTX11*. *Q2610>>AtTX11\_R20C* (A), *Q2610>>AtTX11\_A64T* (B), *Q2610>>AtTX11\_L77M* (C), *Q2610>>AtTX11\_K190N* (D) exhibited stunted growth phenotypes whereas *Q2610>>AtTX11\_R32L49W75Y99/GPRH* (E), *Q2610>>AtTX11\_E43G* (F), *Q2610>>AtTX11\_E79G* (G), *Q2610>>AtTX11\_V101Δ* (H), *Q2610>>AtTX11\_K158Δ* (I) displayed WT-like phenotypes. Scale bars = 0.5mm.

## 5. 생장저해능이 소실된 *AtTX11/12* 돌연변이는 *PR1*의 발현을 유도하지 못한다

*AtTX11/12* 점 돌연변이의 과발현을 유도하였지만 생장저해 표현형이 나타나지 않은 형질전환 식물을 선별하여 *AtTX11/12*와 병저항성 관련 유전자의 발현 양상을 RT-PCR로 조사하였다. 야생형 표현형을 나타낸 *Q2610>>AtTX12\_K150S*, *Q2610>>AtTX11\_E43G*, *Q2610>>AtTX11\_E79G*, *Q2610>>AtTX11\_R32L49W75Y99/GPRH*, *Q2610>>AtTX12\_S24H25/AA*, 그리고 *Q2610>>AtTX12\_R20H25/AA* 형질전환 식물에서는 전사 수준에 차이는 있었으나 모두 돌연변이 *AtTX11* 또는 *AtTX12*가 발현되는 것을 확인하였고, TIR 신호 하류에서 작용하는 병저항성 유전자인 *PR1*은 발현되지 않았으며, 일부 라인에서만 낮은 수준으로 *BGL2*가 발현되었다. 반면에 생장저해 표현형을 나타낸 *Q2610>>AtTX12\_K183K184K196K197/AAAA*, *Q2610>>AtTX12\_N12K*, 그리고 *Q2610>>AtTX12* 형질전환 식물에서는, *AtTX12*의 발현과 함께 높은 수준의 *PR1* 및 *BGL2*의 발현이 확인되었다. 이러한 결과는 특정한 *AtTX11/12* 점 돌연변이를 과발현하는 형질전환된 식물들이 야생형 표현형을 나타내는 이유가 돌연변이 *AtTX11/12*를 낮은 수준으로 발현하기 때문이 아니라 도입된 점 돌연변이로 인하여 *AtTX11/12*의 활성이 소실된 결과, 하류의 병저항성 유전자의 발현을 유도할 수 없기 때문이라는 것을 의미한다. 따라서 *AtTX12*의 24번 세린, 25번 히스티딘, 및 150번 라이신 그리고 *AtTX11*의 43번 글루탐산, 및 32번 아르기닌, 49번 류신, 75번 트립토판, 99번 티로신 중의 한 아미노산은 *AtTX11/12*의 활성에 필수적인 아미노산이라고 예상된다.

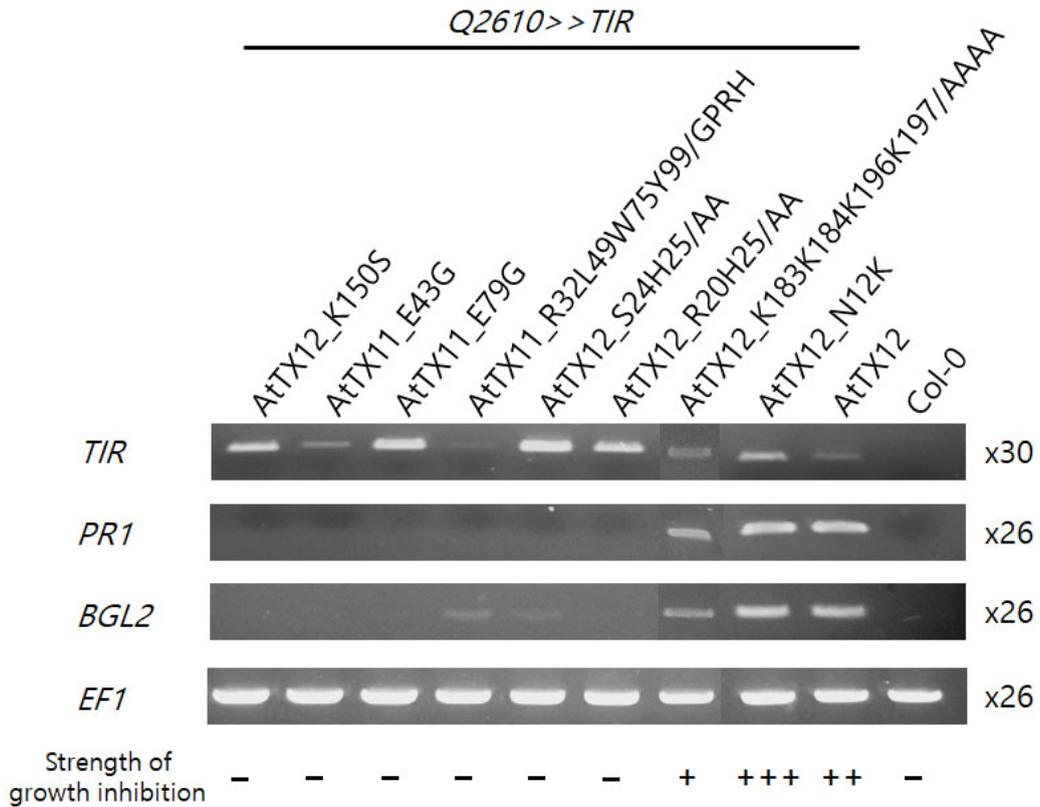


Figure 10. The overexpression of inactive point mutants of *AtTX11/12* failed to induce the expression of both *PR1* and *BGL2*.

The 5-days-old seedlings overexpressing the point mutants of *AtTX11/12* were used for the extraction of the total RNA from which cDNA was synthesized and then PCR amplified with the gene-specific primers for *AtTX12*, *PR1*, *BGL2*, and *EF1* respectively (*AtTX12*, 30 cycles; *PR1*, *BGL2*, and *EF1*, 26 cycles). *TIR* indicates *AtTX12* and *AtTX11/12* mutants

## 6. 무에서 유래한 *AtTX12* 유사 유전자인 *RsTX12*는 애기장대에서 생장저해능을 나타냈다.

*AtTX12*의 유사 유전자를 확보하여 활성을 분석하고자 basic local alignment search tool (BLAST)를 사용하여 검색한 결과 다수의 배추과 작물의 유전체에서 *AtTX12*와 유사한 유전자가 존재함을 확인하였다. 브로콜리(*Brassica oleracea* var. *italica*), 브로콜리의 아종인 콜리플라워(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)와 무(*Raphanus sativus*)의 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 각 종의 *AtTX12* 유사 유전자에 특이적인 primer로 PCR 증폭한 후 클로닝하였으며 이들을 각각 *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12*라고 명명하였다.

*BoiTX12*와 *BobTX12*의 염기서열을 결정하여 비교한 결과, 인트론 영역에서 서로 4개의 차이와 1개의 갭이 확인되어 99.5%의 동질성(1013/1018)을 나타냈으며, *BobTX12*의 염기서열은 양배추(*B. oleracea*)와 유채(*B. napus*) 유전체의 염기서열과 100% 일치하였다. *BoiTX12*와 *BobTX12*는 각각 204개의 아미노산을 암호화하고 있으며 서로 100%의 동질성을 나타냈고 데이터베이스 상에서 유채의 CAF1919942.1 예측 단백질과 일치하였다. 한편, *RsTX12*의 염기서열을 결정한 결과, 무의 유전체 염기서열과 100% (1155/1155) 일치하였으며, 암호화하고 있는 236개의 아미노산 서열은 데이터베이스 상에서 무의 Phloem protein2-like A5 예측 단백질(XP\_018438135.1)에 해당되었다. *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12*의 아미노산 서열은 *AtTX12*와 각각 65.2%, 65.2%, 그리고 56.3%의 동질성을 나타내는 것을 확인하였다. 애기장대의 *AtTX12*, *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12*를 식물의 TIR 도메인들과 함께 MSA를 실행한 결과(Figure 11) *AtTX12*에서 AE interface 형성에 관여할 것으로 추정되는 24번 세린/25번 히스티딘, BB-loop 영역에 보존된 43번 글

루탐산, 그리고 NADase 활성 장소로 예상되는 79번 글루탐산은 모두 AtTX12 유사 단백질에서도 보존되어 있음을 확인하였다. TIR1~4 지역도 AtTX12 유사 단백질에서 공통적으로 보존되어 있는 것을 확인하였다. 또한 AtTX12 유사 단백질 그리고 애기장대의 TIR 도메인 사이의 유연관계를 phylogenetic analysis using parsimony (PAUP) 프로그램을 사용하여 조사한 결과(Figure 12) BoiTX12(BobTX12)는 AtTX12와 가장 높은 유연관계를 나타냈으며, 다음으로는 RsTX12, RBA1, RPP1의 순서로 유연관계가 높은 것으로 판명되었다.

애기장대에서 *AtTX12* 유사 유전자들이 생장저해 활성을 나타내는지 확인하고자 형질전환 애기장대에서 과발현시켰다(Table 5). *Q2610*>>*BoiTX12*와 *Q2610*>>*BobTX12* 형질전환 식물의 경우 각각 6개와 13개의 모든 라인에서 야생형 유사 표현형을 나타냈기 때문에 *BoiTX12*와 *BobTX12*은 적어도 애기장대에서는 생장저해능을 갖지 않는 것으로 보인다. 반면에 *Q2610*>>*RsTX12* 형질전환 식물의 경우, 총 10개의 독립적인 라인 중에서 6개의 라인에서 생장저해 표현형을 나타냈다. 야생형 표현형을 나타낸 *Q2610*>>*BoiTX12*, *Q2610*>>*BobTX12*, 그리고 *Q2610*>>*RsTX12*의 라인은 BASTA 처리 후 생존하는 것을 확인하여 형질전환된 식물임을 검증하였다(Figure 13).

야생형 유사 표현형을 나타낸 *Q2610*>>*BoiTX12*와 *Q2610*>>*BobTX12* 형질전환체 유식물에서 *AtTX12* 유사 유전자와 병저항성 유전자들의 전사 수준을 알아보기로 RT-PCR을 시행하였다(Figure 14). 위의 2개의 형질전환체 라인에서 *AtTX12* 유사 유전자는 발현되었으나 *PR1*과 *BGL2*의 발현은 확인할 수 없었다. 반면에 생장저해 표현형을 나타낸 *Q2610*>>*RsTX12* 형질전환 식물에서는 *RsTX12*의 발현과 함께 *PR1*과 *BGL2*의 전사 수준이 상승한 것을 확인하였다. 이러한 RT-PCR 결과는

*AtTX12* 유사 유전자의 과발현 형질전환 식물의 표현형과 상응하는 결과였으며, *AtTX12*와의 가장 높은 유연관계에도 불구하고 *BoiTX12*와 *BobTX12*는 애기장대에서 성장저해 활성을 나타내지 못한 반면, 상대적으로 약간 낮은 유연관계를 가진 *RsTX12*는 성장저해 활성을 나타냈다.

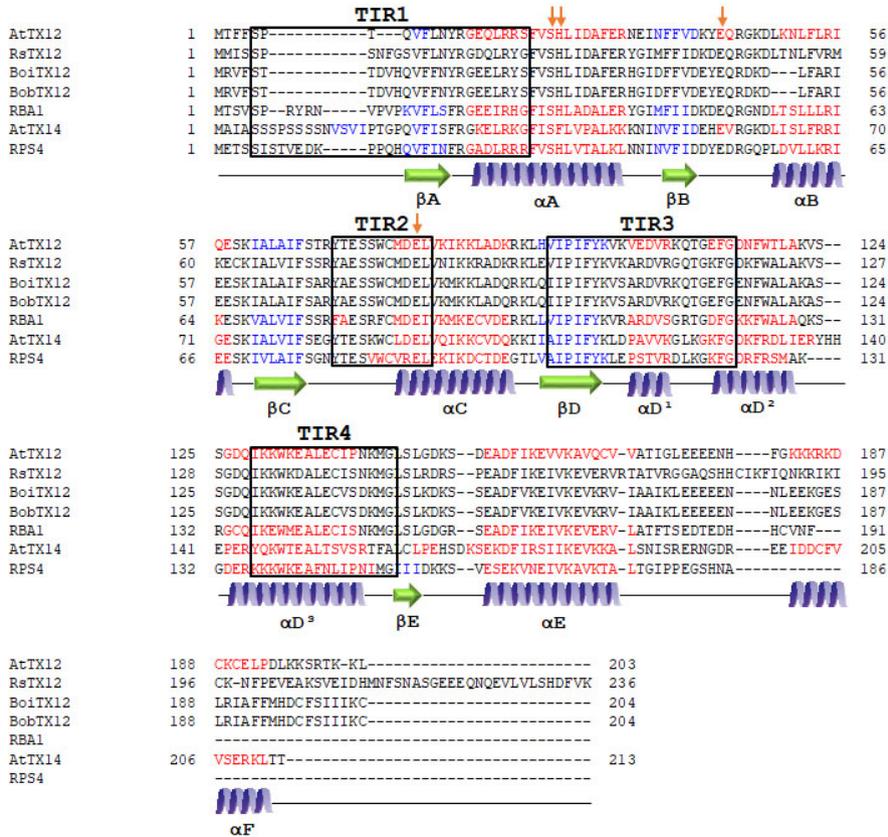


Figure 11. Multiple sequence alignment and secondary structure prediction of TIR domains from Arabidopsis and AtTX12-like proteins originated from crops of Brassicaceae.

This MSA showed the expected  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets of plant TIR domains and showed the four conserved TIR regions through the comparison among TIR domains of Arabidopsis and AtTX12-like proteins originated from crops of Brassicaceae (open black boxes). The arrows indicate the essential amino acids of AtTX11/12 verified in this thesis and conserved among AtTX12 and AtTX12-like proteins.

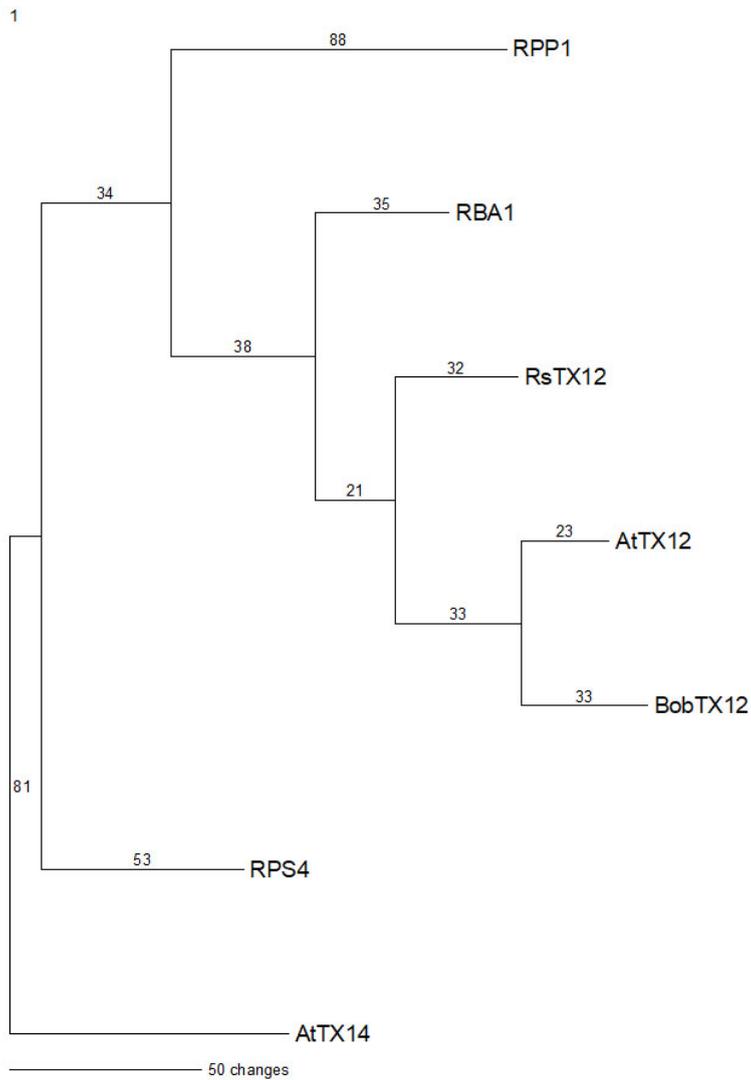


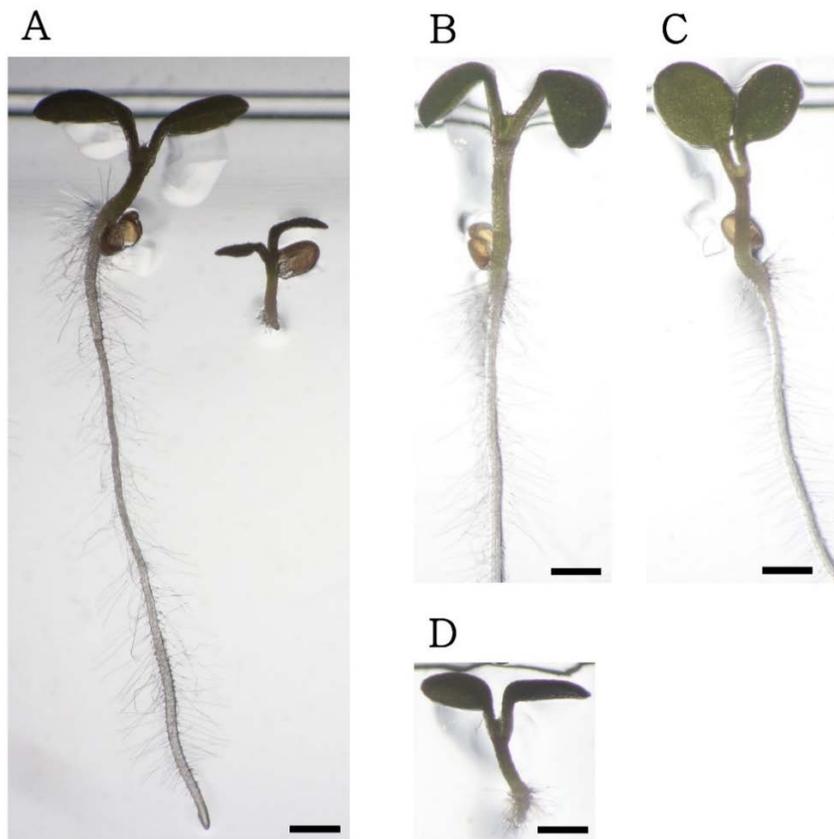
Figure 12. Phylogenetic tree of TIR domains from Arabidopsis and AtTX12-like proteins originated from crops of Brassicaceae.

A phylogenetic tree constructed by PAUP4.0. It showed a close relationship among AtTX12, BoiTX12/BobTX12 and RsTX12.

Table 5. The effects of the overexpression of *AtTX12*-like genes originated from crops of Brassicaceae on growth inhibition of transgenic *Arabidopsis* seedlings

<i>AtTX12</i> -like genes	Strength of growth inhibition
<i>BobTX12</i>	-
<i>BoiTX12</i>	-
<i>RsTX12</i>	+

Strength of the growth inhibition was visually assessed by comparing growth inhibition and presence of root hairs between transgenic seedlings overexpressing the *AtTX12*-like genes and the wild-type *AtTX12*. The following scoring system was used: lack of growth inhibition, -; growth inhibition similar to *AtTX12*, +.



**Figure 13.** The representative phenotypes of transgenic seedlings overexpressing the *AtTX12*-like genes originated from crops of Brassicaceae.

The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing *AtTX12*-like genes originated from Brassicaceae. WT-like (A, left) and *Q2610>>RsTX12* (A, right) siblings of the F1 progenies of a *UASpro:RsTX12* transgenic line crossed to *Q2610*. *Q2610>>BoiTX12* (B) and *Q2610>>BobTX12* (C) exhibited WT-like phenotypes whereas *Q2610>>RsTX12* (D) displayed stunted growth phenotype. Scale bars = 0.5mm.

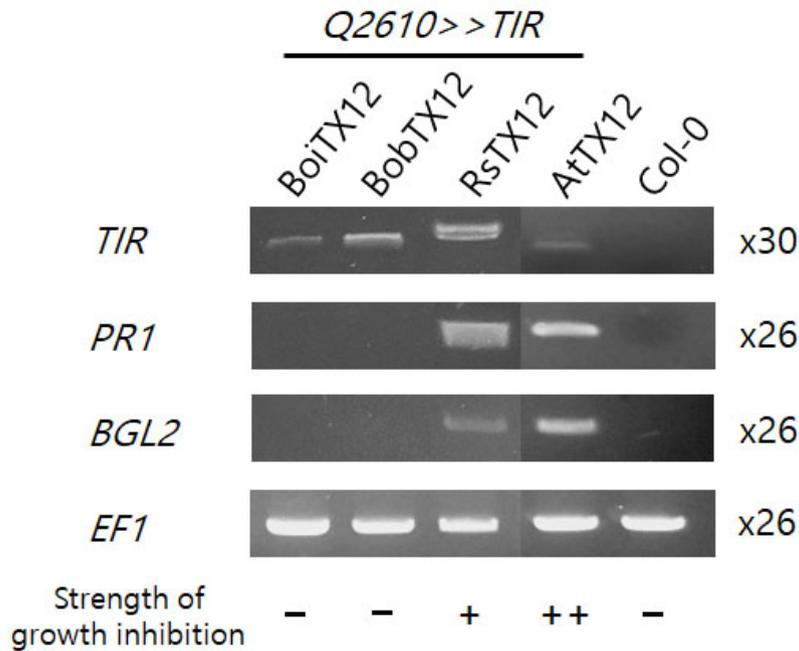


Figure 14. The overexpression of *RsTX12* induced the expression of both *PR1* and *BGL2*.

The 5-day-old seedlings overexpressing the *AtTX12*-like genes originated from crops of Brassicaceae were used for the extraction of the total RNA from which cDNA was synthesized and then PCR amplified with the gene-specific primers for *AtTX12*, *PR1*, *BGL2*, and *EF1*, respectively (*AtTX12*-like, 30 cycles; *PR1*, *BGL2*, and *EF1*, 26 cycles). *TIR* indicates *AtTX12* and *AtTX12*-like genes originated from crops of Brassicaceae.

## 7. AtTX12의 온도 비민감성 활성화에 관여하는 영역 및 아미노산 선별 및 분석

선행 연구 결과, AtTX12는 고온 조건에서도 성장저해능을 발휘했기 때문에 AtTX12의 C-말단 결실 돌연변이에서도 온도 비민감성 활성화가 유지되는지 확인하여 이러한 활성화에 필수적인 영역을 선별하고자 하였다. 성장저해 표현형을 나타내는 *Q2610>>AtTX12*, *Q2610>>AtTX12-CΔ1*, *Q2610>>AtTX12-CΔ2* 그리고 *Q2610>>AtTX12-CΔ3* 형질전환체를 일반적인 조건인 22°C와 고온의 조건인 28°C에서 각각 배양하였다. 흥미롭게도 22°C에서는 성장저해 표현형을 나타내는 *Q2610>>AtTX12-CΔ3* 형질전환체 총 7개 라인 중에서 2개의 라인이 28°C에서 성장저해능을 소실하였다(Figure 15D, H). *Q2610>>AtTX12*, *Q2610>>AtTX12-CΔ1*, 그리고 *Q2610>>AtTX12-CΔ2* 형질전환체의 경우, 성장저해 표현형을 나타내는 모든 라인에서 온도 비민감성 활성을 유지하였다(Figure 15A~C, E~G). 또한 상온에서 성장저해 표현형을 나타내는 모든 *AtTX11/12* 점 돌연변이 과발현 형질전환체 식물들이 온도 비민감성 성장저해 활성을 유지하는지 확인하고자 고온의 조건에서도 배양하였다. 그 결과 *Q2610>>N36D* 형질전환 식물의 경우, 총 8개 라인 중에서 4개 라인은 고온 환경에서 성장저해능이 소실된 표현형을 나타낸 반면(Figure 16C, F), 그 외에 모든 점 돌연변이 라인에서는 온도 비민감성 활성을 유지하였다(Figure 16A, B, D, E). 이러한 결과는 AtTX12가 온도 비민감성 활성을 유지하기 위해서는 최소한 1~173까지의 아미노산이 필요하고, 173번부터 183번 사이의 아미노산이 추가적으로 요구된다는 것을 의미하며, C-말단 영역과는 멀리 떨어진 βB 영역의 36번 아스파라긴도 필수적이라는 것을 의미한다.

한편, *AtTX12*의 과발현에 의해 유도되는 고온 비민감성 성장저해 표현형이

EDS1 의존적인지 확인하기 위하여 야생형 배경의 *Q2610*>>*AtTX12*에 비해서 성장저해능이 크게 약화된 *eds1-2 Q2610*>>*AtTX12* 형질전환 식물을 22°C와 28°C 조건에서 배양하였다. 그 결과 *eds1-2 Q2610*>>*AtTX12* 형질전환체는 두 온도 조건에서 서로 대등한 성장저해 표현형을 나타냈다(Figure 17). 이러한 결과는 *AtTX12*의 고온 비민감성 성장저해능이 EDS1에 비의존적이라는 것을 의미한다.

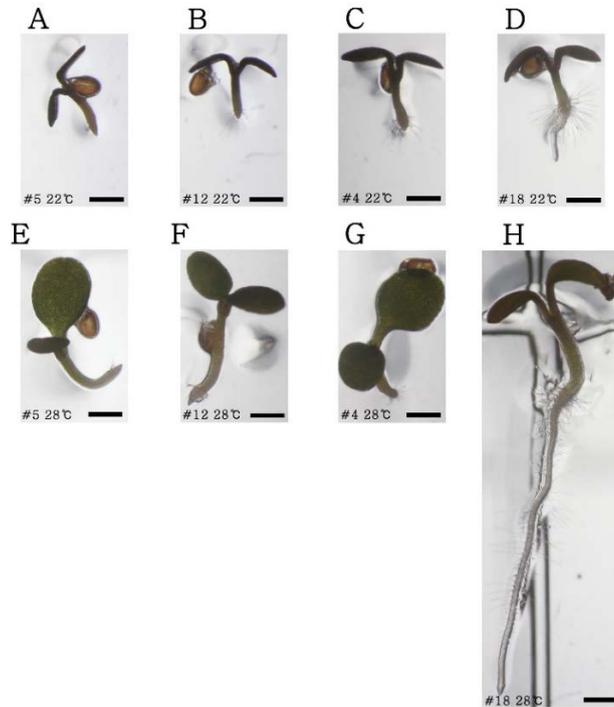
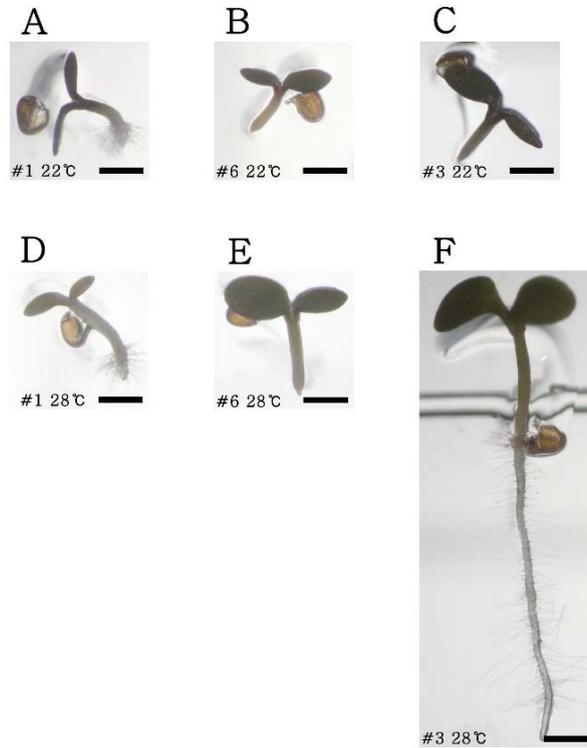


Figure 15. The representative phenotypic changes in seedlings overexpressing C-terminal deletion mutants of *AtTX12* depending on different temperature conditions. The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing C-terminal deletion mutants of *AtTX12* grown at 22°C or 28°C. At 22°C *Q2610>>AtTX12* line #5 (A), *Q2610>>AtTX12-CΔ1* line #12 (B), *Q2610>>AtTX12-CΔ2* line #4 (C), and *Q2610>>AtTX12-CΔ3* line #18 (D) exhibited stunted growth phenotypes. At 28°C. *Q2610>>AtTX12* line #5 (E), *Q2610>>AtTX12-CΔ1* line #12 (F), and *Q2610>>AtTX12-CΔ2* line #4 (G) exhibited stunted growth phenotypes whereas *Q2610>>AtTX12-CΔ3* line #18 (H) displayed WT-like phenotypes. Scale bars = 0.5mm.



**Figure 16.** The representative phenotypic changes in seedlings overexpressing various point mutants of *AtTX12* depending on different temperature conditions.

The phenotypes of 5-day-old seedlings overexpressing point mutants of *AtTX12* grown at 22°C or 28°C. At 22°C *Q2610>>AtTX12\_F10V* line #1 (A), *Q2610>>AtTX12\_K60R* line #6 (B), and *Q2610>>AtTX12\_N36D* line #3 (C) all exhibited stunted growth phenotypes. At 28°C, *Q2610>>AtTX12\_F10V* line #1 (D) and *Q2610>>AtTX12\_K60R* line #6 (E) exhibited stunted growth phenotypes whereas *Q2610>>AtTX12\_N36D* line #3 (F) displayed WT-like phenotypes. Scale bars = 0.5mm.

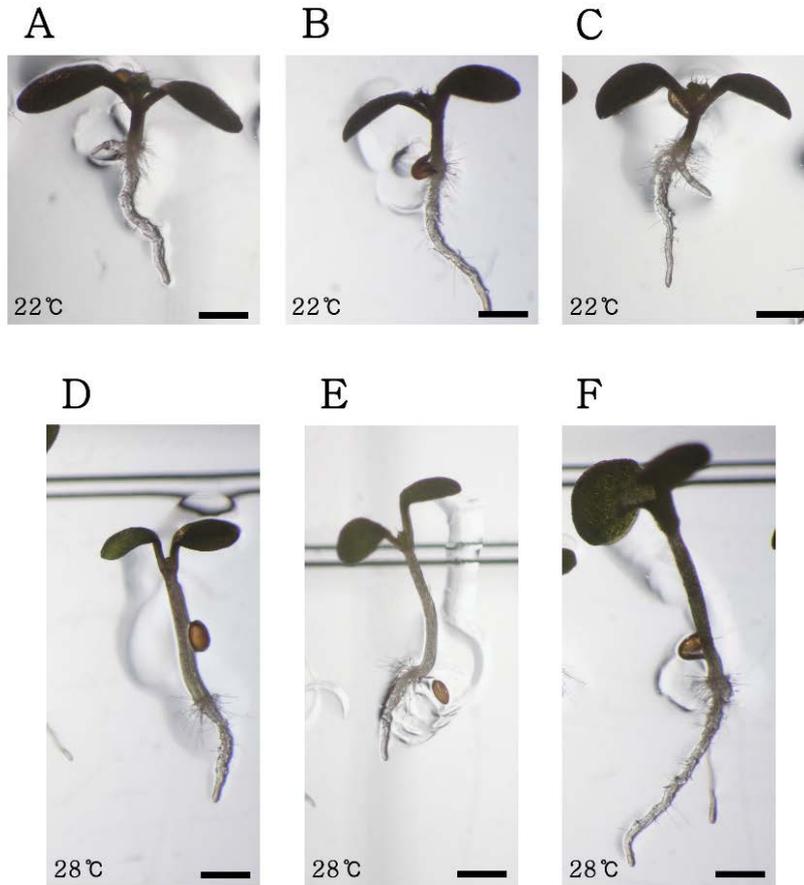


Figure 17. The representative phenotypic changes of *eds1-2 Q2610>>AtTX12* seedlings depending on different temperature conditions.

The phenotypes of 5-day-old *eds1-2* seedlings overexpressing *AtTX12* at 22°C or 28°C. *eds1-2 Q2610>>AtTX12* seedlings grown at both 22°C (A~C) and 28°C (D~F) exhibited weakly stunted growth phenotypes. Scale bars = 0.5mm.

## IV. 논의

식물은 다양한 유형의 R 단백질들을 활용하여 병원체의 공격으로부터 자신을 방어한다. 애기장대의 R 단백질에는 표준적인 TNL외에도 비표준적인 30개의 TX들이 존재하지만 그 중에서 일부의 특성만이 연구된 바 있다. 따라서 TX에 속하는 AtTX11/12의 구조적, 기능적 특성을 규명하는 것은 식물의 저항성 반응에 대한 이해를 증진시킬 것으로 기대할 수 있다.

선행 연구 과정에서 *AtTX11/12*의 과발현은 형질전환된 식물에서 방어 관련 유전자의 발현을 유도하여 성장저해 표현형 나타냈으며, *AtTX12\_R107Δ* 돌연변이의 경우 성장저해능이 소실되어 과발현체는 정상적인 표현형을 나타냈다(Unpublished data). *AtTX11/12*의 발현은 선행연구에서 RT-PCR을 통해서 확인되었지만, 두 유전자 사이의 높은 유사성으로 인해서 각각의 유전자가 실제로 발현되는지는 확인할 수 없었다. 먼저 두 유전자의 cDNA를 클로닝하여 염기서열을 결정 한 결과, *AtTX11/12* 모두 애기장대의 뿌리에서 각각 발현하고 있다는 것을 확인하였다. 따라서, *AtTX12*가 기능하기 위한 최소한의 영역을 탐색하고자 확보된 *AtTX12* cDNA를 활용하여 연속적인 C-말단 결실 돌연변이 유전자를 제조하여 과발현시킨 결과 193, 183, 그리고 173개의 아미노산을 포함한 C-말단 결실 돌연변이(CΔ1, CΔ2, 그리고 CΔ3)는 성장저해능을 보유하고 있는 반면, 163개의 아미노산을 포함한 C-말단 결실 돌연변이(CΔ4)의 경우 높은 수준으로 보존된 TIR1~4 지역을 포함하고 있었으나 성장저해능이 소실되었다(Figure 5). 잠정적인 effector의 존재 없이도 *AtTX12*의 결실 돌연변이가 자가 성장저해능을 나타낸 것은 TNL의 TIR

도메인만을 과발현시키거나 TX를 과발현시킬 때 자가 세포사멸능 또는 자가 성장저해 표현형을 나타내는 이전의 연구와 일치하는 결과이다(Swiderski et al., 2009; Bernoux et al., 2011; Kato et al., 2014; Nishimura et al., 2017). 또한 TIR 도메인의 자가 세포사멸 활성을 위해서는 이량체화나 다량체화가 중요하며 이 과정은 AE interface와 DE interface를 통해서 진행된다(Bernoux et al., 2011; Williams et al., 2014). AtTX12의  $\alpha E$  구조를 유지하고 있는 C $\Delta$ 3 (1~173 a.a.)까지는 성장저해능을 유지했으나,  $\alpha E$  구조가 훼손된 C $\Delta$ 4 (1~163 a.a.)부터는 성장저해능이 소실된 결과는 AtTX12의 성장저해능에도 기존에 연구된 TIR과 마찬가지로  $\alpha E$ 의 보존이 필수적이며 추가적인  $\alpha F$  구조는 필수적이지 않다는 것을 의미한다

더 나아가 RPS4의 TIR 도메인과 RBA1의 이량체화를 위해서는 AE interface를 형성하는  $\alpha A$  영역의 31번 세린과 32번 히스티딘이 필수적이라고 보고되었다(Williams et al., 2014; Nishimura et al., 2017). AtTX12의  $\alpha A$  장소에 존재하는 대등한 위치의 24번 세린과 25번 히스티딘을 알라닌으로 치환한 결과 성장저해능이 소실되었다(Figure 7). 한편, *AtTX11\_R20C*의 경우 성장저해능이 유지되었고 *AtTX12\_R20H25/AA*의 경우 성장저해능이 소실된 결과를 종합하면 25번 히스티딘이 AtTX11/12가 성장저해능을 유지하는데 보다 핵심적이라는 것을 의미한다. 또한, RBA1의 DE interface 상호작용 및 자가 세포사멸능에 필수적이라고 보고된 149번 라이신과 151번 글라이신(Nishimura et al., 2017)과 동등한 위치에 AtTX12의 142번 라이신과 144번 글라이신이 존재하므로 해당 아미노산에 대한 점 돌연변이를 도입하여 AtTX12의 활성화에도 DE interface의 상호작용 및 보존된 아미노산이 필요한지 확인할 필요가 있다.

AtTX11/12 에 대한 무작위적인 돌연변이 도입에도 불구하고 성장저해능을 유지한 돌연변이들은 해당 아미노산 잔기가 일반적인 배양조건에서는 성장저해능에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 즉, AtTX12 의 10 번 페닐알라닌, 12 번 아스파라긴, 36 번 아스파라긴, 60 번 라이신, 168 번 발린과 AtTX11 의 20 번 아르기닌, 64 번 알라닌, 77 번 류신, 190 번 라이신은 성장저해능을 위해 필수적이지 않거나 치환된 아미노산으로 성장저해능이 유지된다는 것을 시사한다(Figure 8, 9).

반면에 무작위적인 돌연변이 도입으로 성장저해능이 소실된 점 돌연변이 중에는 E43G (AtTX11), E79G (AtTX11), 그리고 K150S (AtTX12)가 있었다(Figure 8, 9). 43 번 글루탐산과 150 번 라이신은 각각 BB ( $\beta$ B- $\alpha$ B)-loop 와  $\beta$ E 상에 위치하여 잠정적인 TIR 상호작용 장소인 BE (BB loop- $\beta$ E) interface 를 구성할 것으로 예상된다. 사람 TIR 의 상호작용에서는 경우 BE interface 의 중요성이 이미 연구된 바 있었고(Nimma et al., 2017), 최근에는 식물 TNL 인 ROQ1 과 RPP1 에서 BE interface 의 중요성이 보고된 바 있다 (Bayless and Nishimura, 2020; Martin et al., 2020). 즉 ROQ1 의 경우 resistosome 의 형성 과정에서 BE interface 의 비대칭적인 변형이 유발되며 결과적으로 NADase 효소 활성 부위가 노출된다고 알려졌다(Martin et al., 2020). 따라서, AtTX11/12 에 존재하는 43 번 글루탐산과 150 번 라이신은 NADase 활성을 조절하는 BE interface 의 형성과정을 조절함으로써 성장저해능에 필수적인 기능을 수행하는 것으로 예상된다. 또한 최근 연구 결과에 의하면 비전형적인 동물의 TIR 단백질인 SARM1 의 NADase 활성은 세포 내부의 NAD<sup>+</sup>을 고갈시켜 세포사를 초래한다고 밝혀졌으며, L6, RUN1, 그리고 RPS4 등의 식물 TIR 단백질들에서도 유사한 NADase 활성이 작용하여 하류의 자가 세포사멸능에 필요한 신호물질을 생산하는 것으로 보고된 바 있다(Horsefield et al., 2019; Wan et al.,

2019). 식물 TIR 도메인의 NADase 효소 활성 자리에는 글루탐산이 공통적으로 보존되어 있으며, AtTX11 의 경우 79 번 글루탐산이 효소 활성 자리에 해당되는데(Figure 4) E79G 돌연변이의 경우 성장저해능이 소실된 결과는 AtTX11 의 성장저해능에 잠정적인 NADase 활성 장소가 필수적임을 의미한다. 위의 점 돌연변이 실험 결과를 종합하면, AtTX11/12 의 성장저해능은 유사한 식물 TIR 들과 마찬가지로 AE/BE interface 를 통한 상호작용과 NADase 활성을 필요로 한다고 결론지을 수 있다.

배추과의 세 작물인 브로콜리, 콜리플라워, 그리고 무에서 유래한 *AtTX12* 유사 유전자들의 게놈 DNA를 클로닝하여 각각 *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12*라고 명명하였다. AtTX12는 *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12*와 각각 65.2%, 65.2%, 그리고 56.3%의 동질성을 나타냈으나 애기장대에서 과발현시켰을 경우 *RsTX12*는 성장저해능 표현형을 유도한 반면, *BoiTX12*와 *BobTX12*는 유도하지 못했다(Figure 13). AtTX12와 *BoiTX12*, *BobTX12*, 그리고 *RsTX12* 아미노산 서열을 정렬하여 분석한 결과, AtTX11/12의 성장저해능에 필수적인  $\alpha A$  상의 24번 세린과 25번 히스티딘, BB loop의 43번 글루탐산, 효소 활성 자리의 79번 글루탐산,  $\alpha D3$  상에 보존된 142번 라이신과 144번 글라이신이 모두 보존되어 있었다. 한편 AtTX12에 성장저해능에 필수적인 150번 라이신의 경우 *BoiTX12*와 *BobTX12*에서는 보존된 반면 *RsTX12*에서는 아르기닌으로 치환되었으나 모두 염기성 잔기를 가지고 있었다(Figure 11). 이러한 결과는 배추과에서 유래한 AtTX12 유사 단백질의 애기장대에서의 성장저해능은 AtTX12와 공유하는 보존된 아미노산 외에 다른 영역 또는 다른 아미노산 서열에 의해서 결정된다는 것을 의미한다. 한편 이러한 결과가 *BoiTX12*와 *BobTX12*가 원래 활성이 없는 단백질이어서 성장저해능을 발휘하지 못한

것인지 아니면 애기장대에서만 성장저해 활성이 나타나지 않은 것인지 확인하기  
 위해서 담배에서 *BoiTX12*와 *BobTX12*의 일시적인 과발현을 유도하여 자가세포 사멸  
 활성을 발휘하는지 조사할 필요가 있다.

*AtTX11/12*의 과발현으로 유도된 성장저해 표현형은 28°C의 고온 조건하에서도  
 유지되었으며, 이러한 결과는 애기장대의 다른 TX 유전자인 *AtTX14*의 과발현으로  
 나타난 왜생형 표현형이 고온 비민감성을 나타낸 것과 상응하는 결과이다(Kato et al.,  
 2014). *AtTX11/12*의 고온 비민감성 성장저해능에 필수적인 영역과 아미노산을  
 선별하기 위해서, 22°C 조건에서 성장저해능을 나타냈던 돌연변이 과발현  
 형질전환체들을 28°C 조건에서 배양하여 성장저해능의 유지 여부를 조사한 결과,  
*AtTX12*의 C<sub>1</sub>3 (1~173 a.a.)와 N36D 돌연변이의 경우 고온 조건에서 성장저해능이  
 소실되었다(Figure 15, 16). 따라서 *AtTX12*가 안정적으로 고온 비민감성  
 성장저해능을 유지하기 위해서는 C-말단의  $\alpha E$ 와  $\alpha F$  사이에 존재하는 174~183  
 a.a.의 영역이 요구되며,  $\beta B$  상의 36번 아스파라긴이 필수적이라는 것을 의미한다.  
 기존의 연구에 의하며 *SNC1*의 과대발현에 의한 유도된 *bon1-1*의 왜생형 표현형은  
 고온 조건에 의해서 야생형과 유사하게 회복되며, 이 과정에서 *EDS1*과 *SNC1*의  
 발현이 억제되는 것이 보고된 바 있다(Yang and Hua, 2004). 한편 *snc1* 돌연변이  
 allele 중 하나인 LRR 도메인에 위치한 E640K 돌연변이의 경우 고온 조건에서도  
 활성이 유지되며 유사한 위치에 돌연변이를 도입할 경우 담배의 N 단백질도 고온  
 비민감성 활성을 나타난다고 알려졌다. 또한 이러한 고온 비민감성 돌연변이 TNL  
 들은 핵 내에 축적됨으로 고온 조건에서도 활성을 유지하는 것으로 보고된 바  
 있다(Zhu et al., 2010). 따라서 *AtTX12*에서 선별된 온도 민감성 돌연변이들은 C-  
 말단의 추가적인 결실이나, N36D의 변화에 의해서 아세포적인 축적 위치가 변화하여

고온 비민감성 성장저해능이 소실되었을 가능성이 있다. 또한 고온 조건에서 온도 민감성 돌연변이는 *AtTX12* 사이의 상호작용에 영향을 미치거나 NADase 활성에 직·간접적으로 영향을 미칠 가능성도 있다.

더 나아가 고온 비민감성 성장저해능이 *EDS1* 의존적인지 확인하고자 야생형 배경의 *Q2610>>AtTX12*에 비해서 성장저해능이 크게 약화되어 후기 발달과정을 거쳐 종자형성이 가능한 *eds1-2 Q2610>>AtTX12* 유식물을 22°C와 28°C 조건에서 비교 배양한 결과, 온도 변화에 따른 표현형 차이가 관찰되지 않았다(Figure 17). 이러한 결과는 *AtTX12*에 의한 성장저해능은 *Q2610>>AtTX12*과 *eds1-2 Q2610>>AtTX12* 간의 극명한 표현형 차이에서 알 수 있는 1) *EDS1*-의존적 경로와 상온과 고온 조건에서 공통적으로 *eds1-2 Q2610>>AtTX12*의 성장을 저해할 수 있는 2) *EDS1*-비의존적 고온-비민감성 경로에 의해서 전달된다는 것을 암시한다(Figure 18). 따라서 *eds1-2 AtTX12* 과발현체에 돌연변이를 도입하여 생장이 회복되는 표현형을 가진 돌연변이를 선별할 경우, 2)번의 *EDS1*-비의존적 고온-비민감성 경로에 해당되는 기존에 보고된 바 없는 새로운 성장저해능 또는 병저항성 경로를 선별할 수 있을 것으로 기대된다.

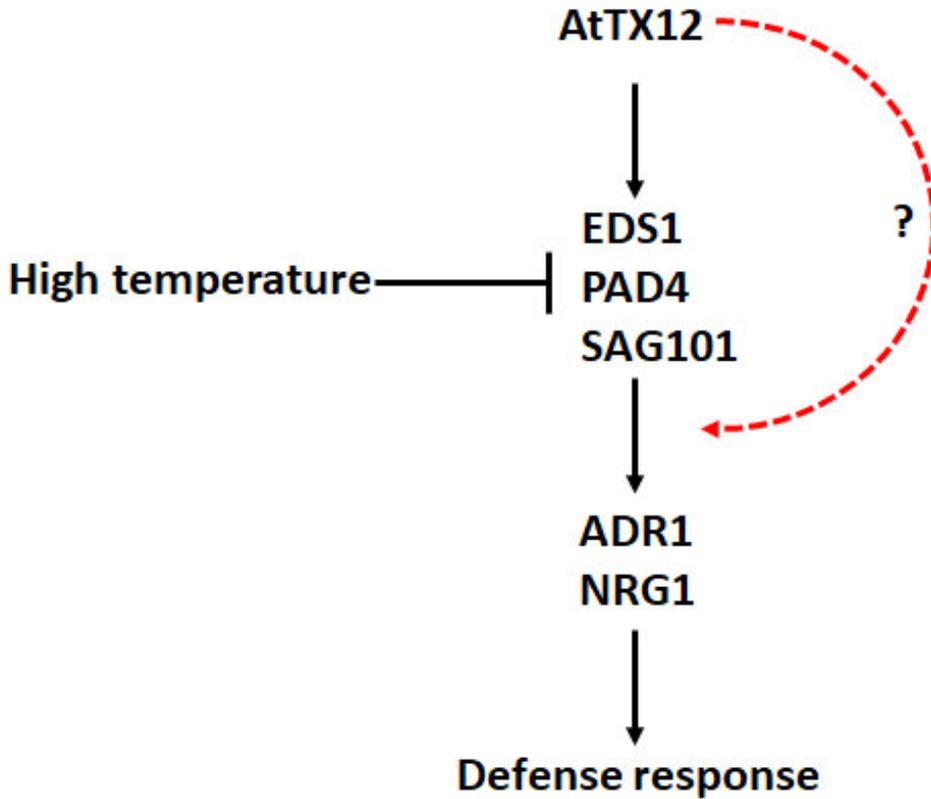


Figure 18. Model of EDS1-dependent and putative EDS1-independent/temperature-insensitive growth inhibition pathway of AtTX12.

- 1) The black arrows indicate the EDS1-dependent signaling pathway of AtTX12.
- 2) The red dashed arrow indicates the putative EDS1-independent/temperature-insensitive signaling pathway of AtTX12.

## V. 참고문헌

- Bayless, A.M., and Nishimura, M.T. (2020). Enzymatic functions for Toll/interleukin-1 receptor domain proteins in the plant immune system. *Frontiers in Genetics* **11**, 539.
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P., and Baulcombe, D.C. (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *The Plant Journal* **32**, 195-204.
- Bernoux, M., Ve, T., Williams, S., Warren, C., Hatters, D., Valkov, E., Zhang, X., Ellis, J.G., Kobe, B., and Dodds, P.N. (2011). Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation. *Cell host & microbe* **9**, 200-211.
- Casey, L.W., Lavrencic, P., Bentham, A.R., Cesari, S., Ericsson, D.J., Croll, T., Turk, D., Anderson, P.A., Mark, A.E., and Dodds, P.N. (2016). The CC domain structure from the wheat stem rust resistance protein Sr33 challenges paradigms for dimerization in plant NLR proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 12856-12861.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Collier, S.M., Hamel, L.-P., and Moffett, P. (2011). Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 918-931.
- Cui, H., Gobbato, E., Kracher, B., Qiu, J., Bautor, J., and Parker, J.E. (2017). A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity. *New Phytologist* **213**, 1802-1817.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**, 539-548.
- Essuman, K., Summers, D.W., Sasaki, Y., Mao, X., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2017). The SARM1 Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Possesses Intrinsic NAD(+) Cleavage Activity that Promotes Pathological Axonal Degeneration. *Neuron* **93**, 1334-1343 e1335.
- Essuman, K., Summers, D.W., Sasaki, Y., Mao, X., Yim, A.K.Y., DiAntonio, A., and Milbrandt, J. (2018). TIR domain proteins are an ancient family of NAD+-consuming enzymes. *Current Biology* **28**, 421-430. e424.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**, 265-276.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E. (2005). *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101

- stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *The Plant Cell* **17**, 2601–2613.
- Gerdtz, J., Brace, E., Sasaki, Y., DiAntonio, A., and Milbrandt, J.** (2015). SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD<sup>+</sup> destruction. *Science* **348**, 453–457.
- Heidrich, K., Wirthmueller, L., Tasset, C., Pouzet, C., Deslandes, L., and Parker, J.E.** (2011). Arabidopsis EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science* **334**, 1401–1404.
- Hofgen, R., and Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* **16**, 9877.
- Horsefield, S., Burdett, H., Zhang, X., Manik, M.K., Shi, Y., Chen, J., Qi, T., Gilley, J., Lai, J.S., Rank, M.X., Casey, L.W., Gu, W., Ericsson, D.J., Foley, G., Hughes, R.O., Bosanac, T., von Itzstein, M., Rathjen, J.P., Nanson, J.D., Boden, M., Dry, I.B., Williams, S.J., Staskawicz, B.J., Coleman, M.P., Ve, T., Dodds, P.N., and Kobe, B.** (2019). NAD(+) cleavage activity by animal and plant TIR domains in cell death pathways. *Science* **365**, 793–799.
- Huh, S.U., Cevik, V., Ding, P., Duxbury, Z., Ma, Y., Tomlinson, L., Sarris, P.F., and Jones, J.D.** (2017). Protein–protein interactions in the RPS4/RRS1 immune receptor complex. *PLoS pathogens* **13**, e1006376.
- Inohara, N., Chamailard, M., McDonald, C., and Nunez, G.** (2005). NOD–LRR proteins: role in host–microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 355–383.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jubic, L.M., Saile, S., Furzer, O.J., El Kasmi, F., and Dangl, J.L.** (2019). Help wanted: helper NLRs and plant immune responses. *Curr Opin Plant Biol* **50**, 82–94.
- Kato, H., Saito, T., Ito, H., Komeda, Y., and Kato, A.** (2014). Overexpression of the TIR-X gene results in a dwarf phenotype and activation of defense-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* **171**, 382–388.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* **16**, 3496–3507.
- Lapin, D., Kovacova, V., Sun, X., Dongus, J.A., Bhandari, D., von Born, P., Bautor, J., Guarneri, N., Rzemieniewski, J., Stuttmann, J., Beyer, A., and Parker, J.E.** (2019). A Coevolved EDS1–SAG101–NRG1 Module Mediates Cell Death Signaling by TIR-Domain Immune Receptors. *Plant Cell* **31**, 2430–2455.
- Maekawa, T., Cheng, W., Spiridon, L.N., Töller, A., Lukasik, E., Saijo, Y., Liu, P., Shen, Q.-H., Micluta, 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 RQQ1 resistosome directly recognizing

- the pathogen effector XopQ. *Science* **370**.
- Meyers, B.C., Morgante, M., and Michelmore, R.W.** (2002). TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *Plant J* **32**, 77-92.
- Nandety, R.S., Caplan, J.L., Cavanaugh, K., Perroud, B., Wroblewski, T., Michelmore, R.W., and Meyers, B.C.** (2013). The role of TIR-NBS and TIR-X proteins in plant basal defense responses. *Plant Physiol* **162**, 1459-1472.
- Nguyen Ba, A.N., Pogoutse, A., Provart, N., and Moses, A.M.** (2009). NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**, 202.
- Nimma, S., Ve, T., Williams, S.J., and Kobe, B.** (2017). Towards the structure of the TIR-domain signalosome. *Current opinion in structural biology* **43**, 122-130.
- 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., El Kasmi, F., Hyunh, M., Osborne Nishimura, E., Sondek, J.E., and Dangl, J.L.** (2017). TIR-only protein RBA1 recognizes a pathogen effector to regulate cell death in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E2053-E2062.
- Peart, J.R., Mestre, P., Lu, R., Malcuit, I., and Baulcombe, D.C.** (2005). NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. *Current biology* **15**, 968-973.
- Qi, D., and Innes, R.W.** (2013). Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. *Frontiers in Immunology* **4**, 348.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E10979-E10987.
- Song, S.-K.** (2016). Misexpression of AtTX12 encoding a Toll/interleukin-1 receptor domain induces growth defects and expression of defense-related genes partially independently of EDS1 in Arabidopsis. *BMB reports* **49**, 693.
- Swiderski, M.R., Birker, D., and Jones, J.D.** (2009). The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death induction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 157-165.
- Tameling, W.I., Elzinga, S.D., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L., Haring, M.A., and Cornelissen, B.J.** (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *The Plant Cell* **14**, 2929-2939.
- Tapping, R.I.** (2009). Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. In *Seminars in immunology* (Elsevier), pp. 175-184.
- Torres, M.A., Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* **141**, 373-378.
- Vyncke, L., Bovijn, C., Pauwels, E., Van Acker, T., Ruysinck, E., Burg, E., Tavernier, J., and Peelman, F.** (2016). Reconstructing the TIR Side of the Myddosome: a

- Paradigm for TIR-TIR Interactions. *Structure* **24**, 437–447.
- 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.
- Wan, L., Essuman, K., Anderson, R.G., Sasaki, Y., Monteiro, F., Chung, E.-H., Nishimura, E.O., 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.
- 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**.
- Williams, S.J., Sornaraj, P., deCourcy-Ireland, E., Menz, R.I., Kobe, B., Ellis, J.G., Dodds, P.N., and Anderson, P.A. (2011). An autoactive mutant of the M flax rust resistance protein has a preference for binding ATP, whereas wild-type M protein binds ADP. *Molecular plant-microbe interactions* **24**, 897–906.
- Williams, S.J., Yin, L., Foley, G., Casey, L.W., Outram, M.A., Ericsson, D.J., Lu, J., Boden, M., Dry, I., and Kobe, B. (2016). Structure and function of the TIR domain from the grape NLR protein RPV1. *Frontiers in plant science* **7**, 1850.
- Williams, S.J., Sohn, K.H., Wan, L., Bernoux, M., Sarris, P.F., Segonzac, C., Ve, T., Ma, Y., Saucet, S.B., Ericsson, D.J., Casey, L.W., Lonhienne, T., Winzor, D.J., Zhang, X., Coerdt, A., Parker, J.E., Dodds, P.N., Kobe, B., and Jones, J.D. (2014). Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* **344**, 299–303.
- Wirthmueller, L., Zhang, Y., Jones, J.D., and Parker, J.E. (2007). Nuclear accumulation of the Arabidopsis immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. *Current Biology* **17**, 2023–2029.
- Wu, Z., Li, M., Dong, O.X., Xia, S., Liang, W., Bao, Y., Wasteneys, G., and Li, X. (2019). Differential regulation of TNL-mediated immune signaling by redundant helper CNLs. *New Phytologist* **222**, 938–953.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L., and Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111–115.
- Yang, S., and Hua, J. (2004). A haplotype-specific Resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 1060–1071.
- Zhang, X., Bernoux, M., Bentham, A.R., Newman, T.E., Ve, T., Casey, L.W., Raaymakers, T.M., Hu, J., Croll, T.I., and Schreiber, K.J. (2017). Multiple functional self-association interfaces in plant TIR domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E2046–E2052.
- Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X., and Li, X. (2003). A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of

downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *The Plant Cell* **15**, 2636-2646.

**Zhao, T., Rui, L., Li, J., Nishimura, M.T., Vogel, J.P., Liu, N., Liu, S., Zhao, Y., Dangi, J.L., and Tang, D.** (2015). A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70B1* mutant. *PLoS genetics* **11**, e1004945.

**Zhu, Y., Qian, W., and Hua, J.** (2010). Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS pathogens* **6**, e1000844.