

拟南芥富含亮氨酸重复序列类受体激酶AtLRR78A的定位及其分选序列研究

王愿, 王晓坤, 戈海曼, 杨磊*

南京大学生命科学学院, 南京210093

摘要: 富含亮氨酸重复类受体蛋白激酶(LRR-RLKs)是类受体蛋白激酶家族中已知的最大的亚家族。目前的研究表明: LRR-RLKs包含一个胞外的LRR结构域和一个胞内丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶结构域, 能够充当胞外信号的受体从而参与各种环境及发育信号的感知和传递。虽然所有的相关报道都显示LRR-RLKs定位于细胞质膜, 但LRR-RLK在胞内分选运输的机制仍不是很清楚。在本研究中, 我们分析了一种典型的LRR-RLK (AtLRR78A), 它进行反式高尔基网络(TGN)、液泡前体(PVC)和液泡(vacuolar)的分选运输。AtLRR78A的N端共960 aa (NT960)在质膜的形成过程中扮演着重要的角色, 但其C端共1 056 aa (CT1056)不是质膜定位所必需的。同时我们发现AtLRR78A的NT960可以引导AtVSR2从PVC转位到液泡膜(TP), 并且仅AtVSR2的CT1056就能使定位在质膜的AtLRR78A分选运输到PVC和液泡膜。

关键词: LRR-RLKs; AtLRR78A; 质膜; 蛋白质分选运输

在拟南芥基因组中有超过200个富含亮氨酸重复类受体蛋白激酶(leucine-rich repeat receptor-like kinases, LRR-RLKs), 这些受体激酶在胞外往往含有1~32个富含亮氨酸的重复区域, 并且这些结构域经常参与蛋白-蛋白的相互作用(Kobe和Deisenhofer 1994)。目前已有研究表明: LRR-RLKs在植物生长发育过程中扮演着重要的角色, 如CLAVATA1 (Clark等1997)、油菜素内酯(brassinolide receptor, BR)受体BRI1 (Wang等2001; Bucherl等2013)、鞭毛蛋白受体FLS2 (Gómez-Gómez等2001)、脱落酸(abscisic acid, ABA)信号感知RPK1 (Osakabe等2005)、调节细胞壁功能的FEI1、FEI2 (Xu等2008)等。

细胞表面受体传递胞外信号要通过胞内的分选运输, 从而传递到特异的亚细胞器和组分, 以实现信号传递的有效性和特异性(Teis等2002; Geldner等2007; Gifford等2005; Robatzek等2006)。对植物细胞表面受体的研究表明, 配体诱导的组成型内吞为胞内激活受体积累、再循环和降解的分选运输途径提供了坚实的证据。动物中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表现出很明显的配体诱导的内吞, 导致其在质膜内吞后进入降解途径, 这个过程在信号终止时很重要, 同时也是下游信号MAPK (mitogen-activated protein kinase)有效装配所需要的步骤(Teis等2002)。在植物中, flg22能够激活FLS2受体, 使FLS2内吞(Robatzek等2006)。此外, 蛋白磷酸酶2A抑制剂斑蝥素(cantharidin)影响FLS2的亚细胞分选(Serrano等2007)。另一个重

要的例子是, BRI1感知内源的BR, 并且通过受体介导的内吞组成型地转导BR信号(Geldner等2007)。质膜上的受体的内吞过程现已成为植物细胞生物学研究的焦点。

真核细胞的分泌途径包含一套膜结构网络, 由一系列具有特殊功能的特征蛋白所定义的细胞结构组成。这种细胞结构包括内质网(endoplasmic reticulum, ER)、高尔基体(Golgi apparatus, GA)、反式高尔基网络(trans-Golgi network, TGN)、液泡前体(pre-vacuolar compartment, PVC)、液泡膜(tonoplast, TP)和质膜(plasma membrane, PM)。质膜作为细胞的屏障, 驻留了成百上千的功能蛋白, 它们有些可以作为离子转运体运输各种离子进出细胞, 还有的如细胞表面受体之类的蛋白在细胞通讯等重要信号转导过程中扮演着重要的角色。在细胞膜结构网络中, TGN作为一个分选运输枢纽, 可以识别不同功能的蛋白, 使其分泌到质膜上或者输送到液泡中降解。但是我们仍然不清楚各种功能的蛋白在细胞内究竟是如何分选运输到各个细胞器的, 以及不同蛋白所具有的信号序列是依据什么决定它们的去向。

我们所研究的LRR-RLK亚细胞定位的动态变化代表了其在植物细胞中的分选运输过程, 揭示了质膜定位的受体通过内吞进入TGN、PVC以及

收稿 2016-10-31 修定 2017-02-05

资助 江苏省自然科学基金青年基金(BK2012306)。

* 通讯作者(E-mail: leiyang@nju.edu.cn)。

液泡的细胞生物学机制。通过分子生物学手段构建缺失不同结构域的表达载体进行的亚细胞定位分析,表明了N端和C端在LRR-RLKs亚细胞定位过程中的不同作用,证明N端对LRR-RLKs的质膜亚细胞定位起着决定性的作用, C端负责受体内吞传递信号到胞内,并不能改变LRR-RLKs的亚细胞定位,替换LRR-RLKs的C端为AtVSR2的C端后, LRR-RLKs明显进入降解途径,也同时证明了定位在PVC的AtVSR2的C端含有某种可以导致蛋白进入降解途径的定位信号。

材料与方 法

1 AtLRR78A的载体构建

拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]基因At2g01210 (AtLRR78A)的完全开放读码框和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)序列融合,经由SmaI-SacI酶切插入到植物瞬时表达载体pBI221中,由启动子CaMV35S驱动蛋白在细胞中表达。此外,AtLRR78A的N端和跨膜区共1 095 bp通过SmaI-SalI酶切,AtVSR2的C端通过SalI-XhoI酶切并与GFP融合加入到植物表达载体pBI221中,由启动子CaMV35S驱动蛋白在细胞中表达。AtLRR78A的N端960 bp通过SmaI-SalI酶切、AtVSR2的跨膜区与C端通过SalI-XhoI酶切并与GFP序列融合加入到植物表达载体pBI221中,由启动子CaMV35S驱动蛋白在细胞中表达。

2 AtLRR78A蛋白亚细胞定位分析

拟南芥悬浮培养的细胞在27°C、避光、130 r·min⁻¹摇床中振荡培养。选取培养3 d的细胞用于原生质体分离,细胞经过沉淀后,放入酶解液{4.3 g·L⁻¹ MS盐、0.4 mol·L⁻¹蔗糖、500 mg·L⁻¹吗啉乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) hydrate]、750 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O、250 mg·L⁻¹ NH₄NO₃、1% (m/V)纤维素酶、0.05%果胶酶、0.2%崩溃酶(driselase from *Basidiomycetes* sp.), pH 5.7}中130 r·min⁻¹振荡培养。培养后,细胞用电转化缓冲液{0.4 mol·L⁻¹蔗糖、2.4 g·L⁻¹羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES]、6 g·L⁻¹ KCl、600 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, pH 7.2}在80×g离心条件下洗3次,取至少10 μg质粒DNA混合到500 μL原生质体中,然后在130 V和1 000 μF条件下进行电转化。之后放入到培养箱中过夜培养,培养后的细胞进

行共聚焦显微镜(蔡司LSM710)观察。GFP通道使用的激发波长为490 nm,接收波长为495~525 nm。红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)通道使用的激发波长为543 nm,接收波长为580~645 nm。

3 药物处理

渥曼青霉素(wortmannin, Wort)和布雷菲德菌素A (brefeldin A, BFA)溶解到二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)中制备储存液1 mmol·L⁻¹ Wort和50 mmol·L⁻¹ BFA。使用前用MS液体培养基稀释到工作浓度,按照处理时间收获细胞进行共聚焦显微镜观察。

实验结果

1 AtLRR78A部分定位于质膜和PVC

拟南芥原生质体亚细胞定位分析表明,AtLRR78A定位在细胞质膜和胞内点状细胞器中,AtLRR78A可以与液泡分拣受体(VSR2)共定位。Wort能够抑制PVC的融合(Emans等2002),在经过16.5 μmol·L⁻¹ Wort处理1 h后,AtLRR78A可以与VSR2共同定位在增大的戒指形状结构中,表明部分AtLRR78A定位在PVC中(图1-A)。同时,AtLRR78A不能和高尔基定位的细胞器marker (Man1)共定位。BFA是一种常用的囊泡转运抑制剂,它可以促使高尔基体解体和TGN积聚。用20 μmol·L⁻¹ BFA处理后,表达有AtLRR78A的点状细胞器和标记有Man1的高尔基体都发生了聚集,但两种细胞器在相互分开的同时却又距离相近,表明AtLRR78A并没有定位到高尔基体,但是存在定位在TGN上的可能(图1-B)。

2 AtLRR78A胞内定位的点状细胞器是TGN

TGN起源于高尔基体,是植物内吞途径的早期组分,将“货物”分拣到质膜或者从质膜上接收需要内吞的“货物”(Dettmer等2006)。AtLRR78A可以和定位于TGN的marker (SYP61)共定位,当用10或20 μmol·L⁻¹的BFA处理后,表达有AtLRR78A的点状细胞器和标记有SYP61的TGN都发生了聚集,并且能够重叠,表明AtLRR78A胞内定位的点状细胞器是TGN (图2)。

3 AtLRR78A可以与OsSCAMP1在质膜和TGN共定位

水稻(*Oryza sativa*) SCAMP1 (OsSCAMP1)定位在质膜和早期内体结构TGN中,药物处理表明该蛋白胞内定位的点状细胞器和高尔基体以及PVC是

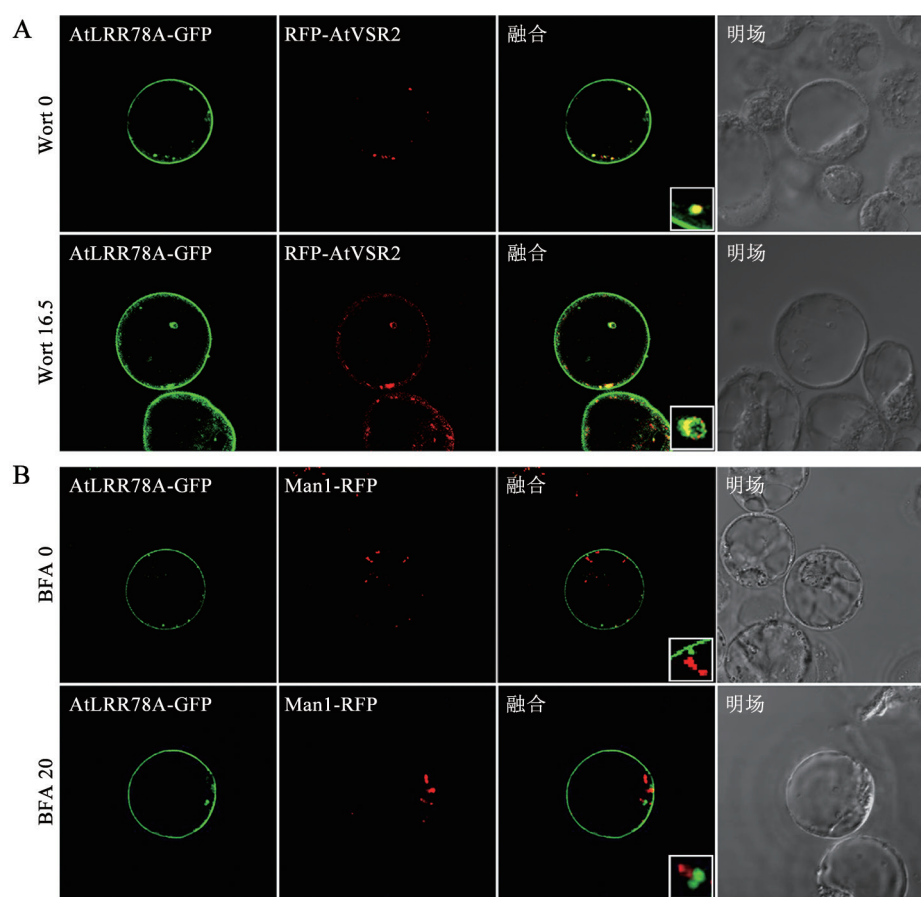


图1 AtLRR78A蛋白定位在质膜和PVC但不定位在高尔基体上

Fig.1 AtLRR78A protein localized at plasma membrane and PVC, but not GA

A: AtLRR78A与PVC的marker AtVSR2共定位; B: AtLRR78A不与高尔基的marker Man1共定位。

有区别的, 荧光染料FM4-64是一种细胞内吞的示踪分子, 它在到达PVC之前会先到达OsSCAMP1所标记的细胞器, 表明OsSCAMP1定位在早期内体结构TGN中(Lam等2007)。因此, 该蛋白可以用于分析质膜蛋白内吞分选到TGN过程的一个有用的标记蛋白。

在瞬时转化的原生质体细胞中, AtLRR78A可以与OsSCAMP1在细胞膜和胞内点状的细胞器共定位, 并可以与BFA引起的聚集体共同定位。刀豆素A (concanamycin A, Conc A)是一个V-ATPase的抑制剂, 阻止后期TGN的分选运输(Robinson等2004)。经过我们的实验观察发现, Conc A处理后, AtLRR78A可以与OsSCAMP1共同定位在TGN聚集体上, 表明质膜蛋白被驻留在了TGN中。因此进一步证明了AtLRR78A胞内定位的点状细胞器是TGN(图3)。

4 AtLRR78A合成起始于内质网

内质网被认为是分泌途径中蛋白从膜泡分选运输到下游细胞器的一个起始合成部位(Hanton等2006), 为了检测AtLRR78A分选运输是否需要COPII膜泡, 我们构建了Sec12p和ARF1突变的表达载体并在拟南芥原生质体进行瞬时转化。Sec12p是一个Sar1p特异的鸟嘌呤核苷酸交换因子, 介导COPII膜泡的形成(Phillipson等2001)。ARF1在高尔基体中负责COPI膜泡从高尔基体出芽过程(Pimpl等2000, 2003)。过表达Sec12p和ARF1的突变体可以中断分泌蛋白在内质网和高尔基体之间的运输过程, 使得蛋白驻留在内质网中。我们通过同时表达AtLRR78A、高尔基体的marker (Man1)以及Sec12p和ARF1突变体, 发现AtLRR78A和Man1均驻留在了内质网中(图4), 表明AtLRR78A是在内质网中合成的, 通过内质网将该蛋白分泌到下游的细胞器中。

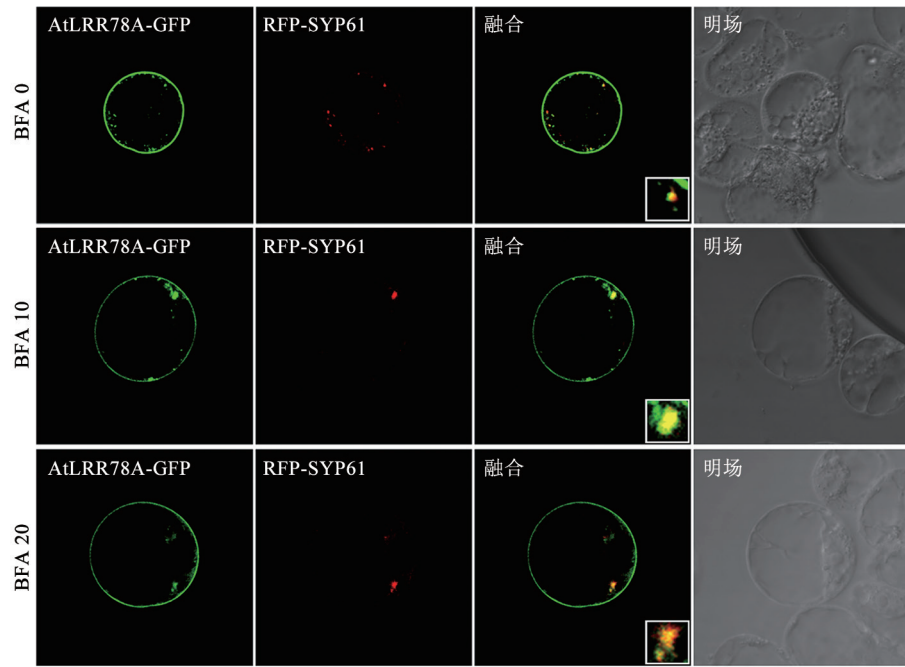


图2 AtLRR78A胞内的部分点状结构定位在TGN中

Fig.2 The partial intracellular dot structure of AtLRR78A localized at TGN

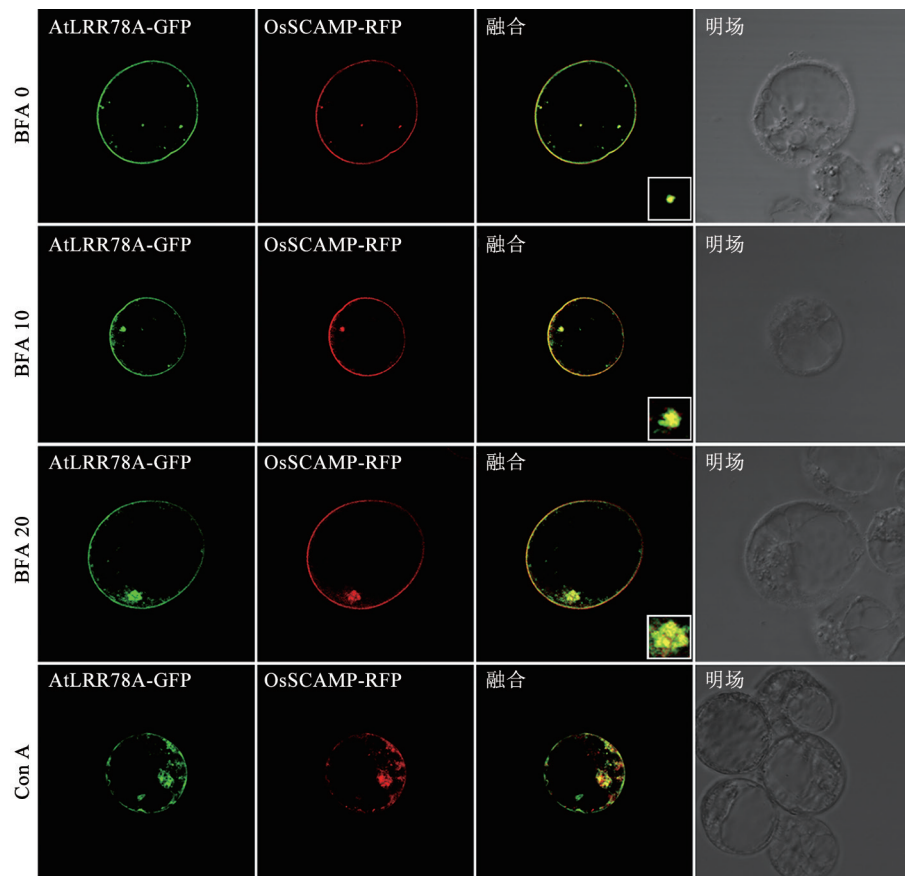


图3 AtLRR78A胞内定位的部分点状结构可以与OsSCAMP胞内点状结构共定位

Fig.3 The partial intracellular dot structure of AtLRR78A co-localized with OsSCAMP

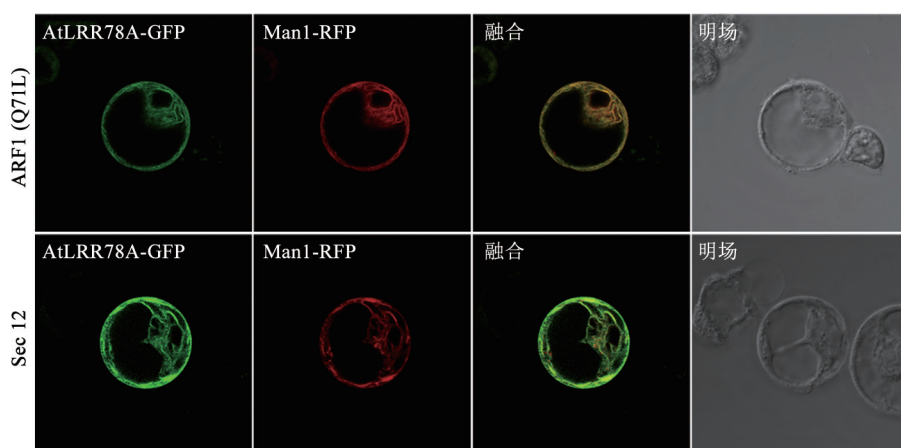


图4 AtLRR78A在内质网中合成

Fig.4 AtLRR78A initial synthesis from endoplasmic reticulum

5 AtLRR78A快速降解发生在液泡中

目前已有研究证明,液泡蛋白是通过内质网→高尔基体→TGN→PVC这一分泌途径抵达液泡的(Hanton等2007),而质膜蛋白在质膜内吞后也是经由PVC到液泡中完成降解的(Robatzek等2006; Takano等2005),这种降解途径是受体激活后信号终止的有效机制。AtLRR78A作为细胞表面受体,受体激活和信号终止有着精确的调节机制。我们的研究表明,AtLRR78A经过PVC途径最终会在液泡中降

解,并且降解速度明显快于OsSCAMP1和Man1。经过12或24 h的原生质体培养,AtLRR78A明显降解在液泡中(图5)。

6 不含C端的AtLRR78A和全长AtLRR78A在质膜和胞内细胞器共定位

为了探索AtLRR78A的C端是否影响蛋白的质膜定位,我们构建了仅含AtLRR78A N端和跨膜结构域的蛋白表达载体AtLRR78A(Δ CT)。在拟南芥原生质体中表达后,我们发现C端结构域不影响

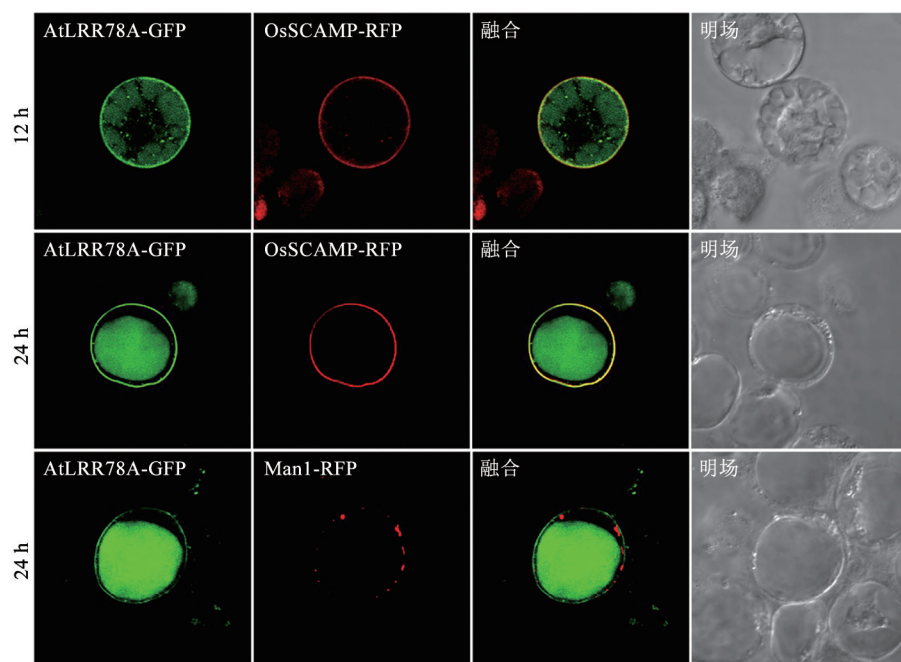


图5 AtLRR78A快速降解到液泡中

Fig.5 AtLRR78A degrades rapidly in lytic vacuolar

该蛋白的亚细胞定位,并且在BFA处理和不处理条件下AtLRR78A(Δ CT)表现出和全长蛋白一致的定位结果(图6)。

7 AtLRR78A的N端可以引导AtVSR2从PVC转位到液泡膜

为了验证AtLRR78A的N端在蛋白亚细胞定位过程中的功能,我们进行了N端缺失的载体构建(图7-A)。研究表明,缺失了AtLRR78A的N端,无论将GFP放在基因的前端还是后端,即使添加了信号肽也都会显现出内质网的亚细胞定位模式,这表

明了N端对AtLRR78A正确定位的重要作用(图7-B)。

AtLRR78A(Δ CT)定位在质膜、胞内TGN和PVC中,将VSR2的C端连接到AtLRR78A(Δ CT)的C端后,质膜定位消失,有近75%的细胞表现出了液泡膜定位(图8-A和B)。此外,将AtLRR78A的N端连接到PVC定位的VSR2上以后,有近60%的细胞VSR2表现出了液泡膜定位,这表明AtLRR78A的N端存在指导蛋白定位在质膜或者液泡膜的信号,并且VSR2的C端对蛋白降解途径起着决定性的引导作用,可以将质膜蛋白分选到液泡膜(图8-C和D)。

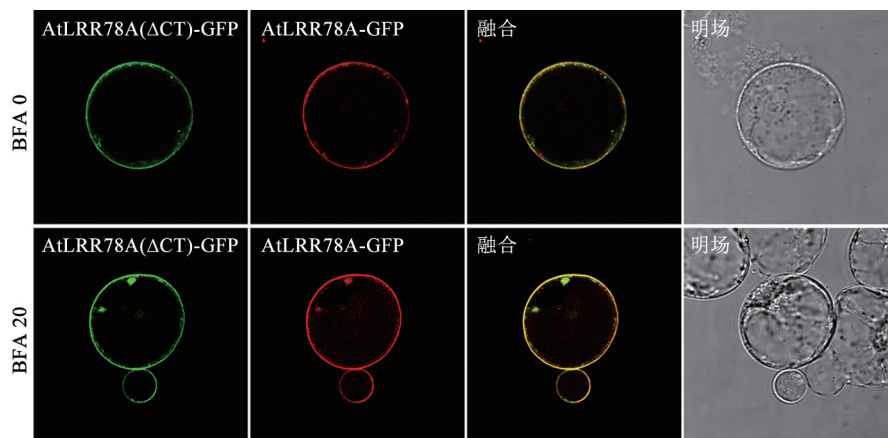


图6 不含C端的AtLRR78A蛋白与全长AtLRR78A蛋白可以完全共定位

Fig.6 AtLRR78A protein without C-terminal could fully co-localize with AtLRR78A protein in PM and intracellular organelle

讨 论

LRR-RLKs被广泛认为是定位在细胞质膜上的一类能够感知外界环境信号,并将信号传递到胞内相应部位的细胞表面受体蛋白。越来越多的LRR-RLKs已经被发现,其中一部分已经阐明了具体的功能特点。在拟南芥中BRI1负责感知BR,转基因BRI1-GFP融合蛋白的拟南芥通过荧光信号在根分生组织中揭示了BRI1主要表达在质膜以及胞内膜泡中(Geldner等2007)。BRI1可以和荧光染料FM 4-64以及TGN的marker VHA-a1-RFP共定位,除此之外, BRI1-GFP对BFA十分敏感的特性表明该受体在细胞中处于不断的循环状态。拟南芥基因FLS2编码一个细菌flagellin (flg22)的受体,非激活状态下的FLS2主要定位在细胞质膜上,当该受体被flg22激活后,会被转位到内膜系统,然而FLS2对BFA并不敏感,表明其与BRI1有着不同的信号转导机制(Robatzek等2006)。

所有的真核细胞都包含一个分泌途径的内膜系统,由几个功能上有区别的膜结构细胞器组成,包括内质网、高尔基体、PVC和液泡(Lam等2005; Cui等2014)。这个内膜系统是十分复杂的,各个细胞器可以由已经报道过的marker来标记,以研究各种蛋白的亚细胞定位和细胞生物学功能。植物细胞区别于其他物种的一个重要特点就是其自身含有酸化的水解液泡和蛋白存储液泡。一些可溶性的蛋白可以到达液泡或者蛋白存储液泡都是因为其自身含有液泡分拣的决定信号,并由液泡分拣受体(vacuole sorting receptor, VSR)来识别。PVC最初被识别作为液泡蛋白分拣的中间细胞器发挥功能(Miao等2008),但近几年研究发现PVC在质膜蛋白的循环和降解过程中也发挥着一定的作用。

研究中,我们将蛋白瞬时表达在拟南芥原生质体中,并利用亚细胞定位等技术手段,分析阐明了一个典型的LRR-RLK——AtLRR78A在信号分

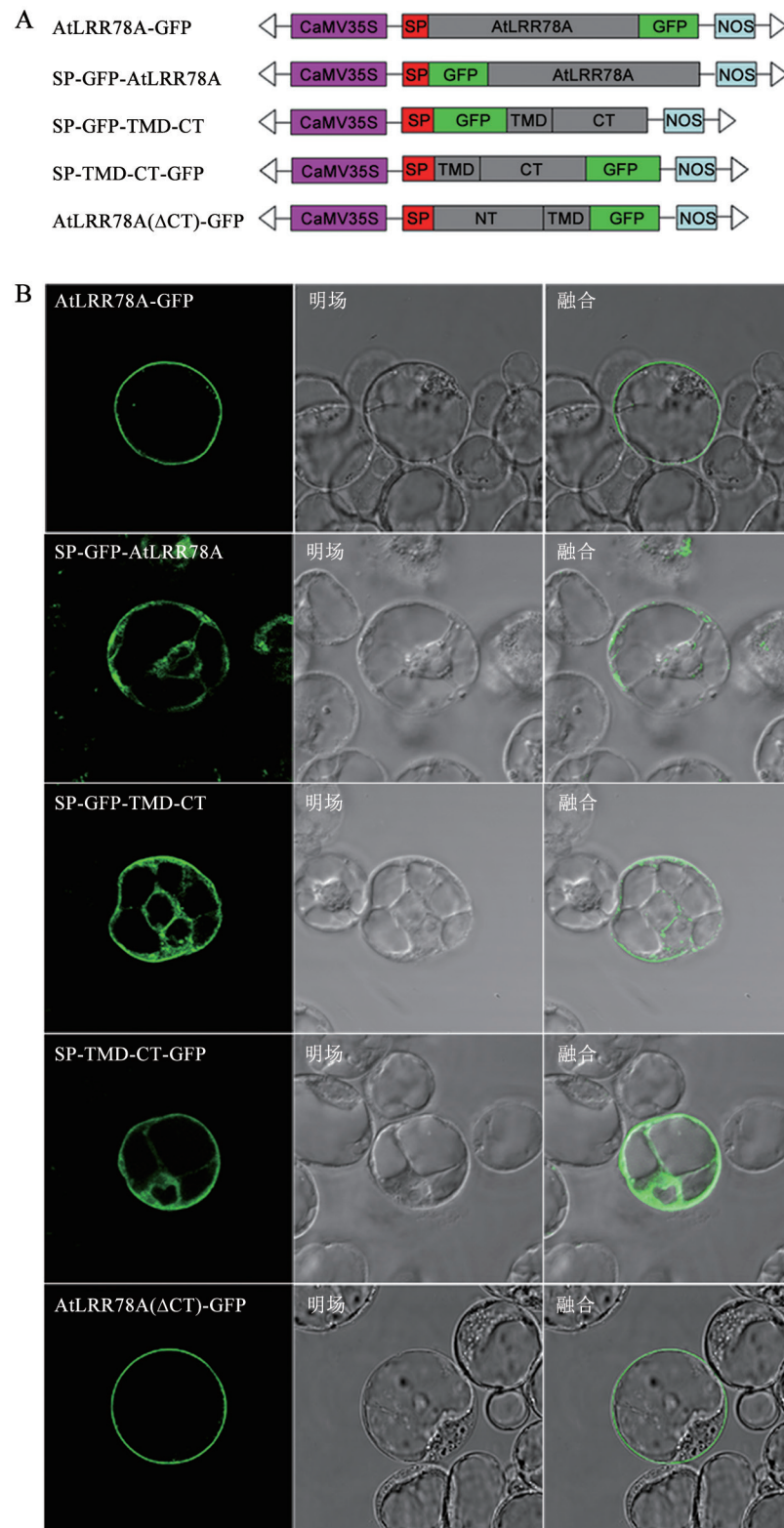


图7 AtLRR78A蛋白不同结构域对亚细胞定位的影响

Fig.7 Different domains of AtLRR78A protein affected subcellular localization

A: 载体结构示意图; B: 不同载体构建在原生质体中表达并进行亚细胞定位分析。AtLRR78A(Δ CT): AtLRR78A不含碳末端; SP: 信号肽; TMD: 跨膜区; NT: 氮末端; CT: 碳末端。

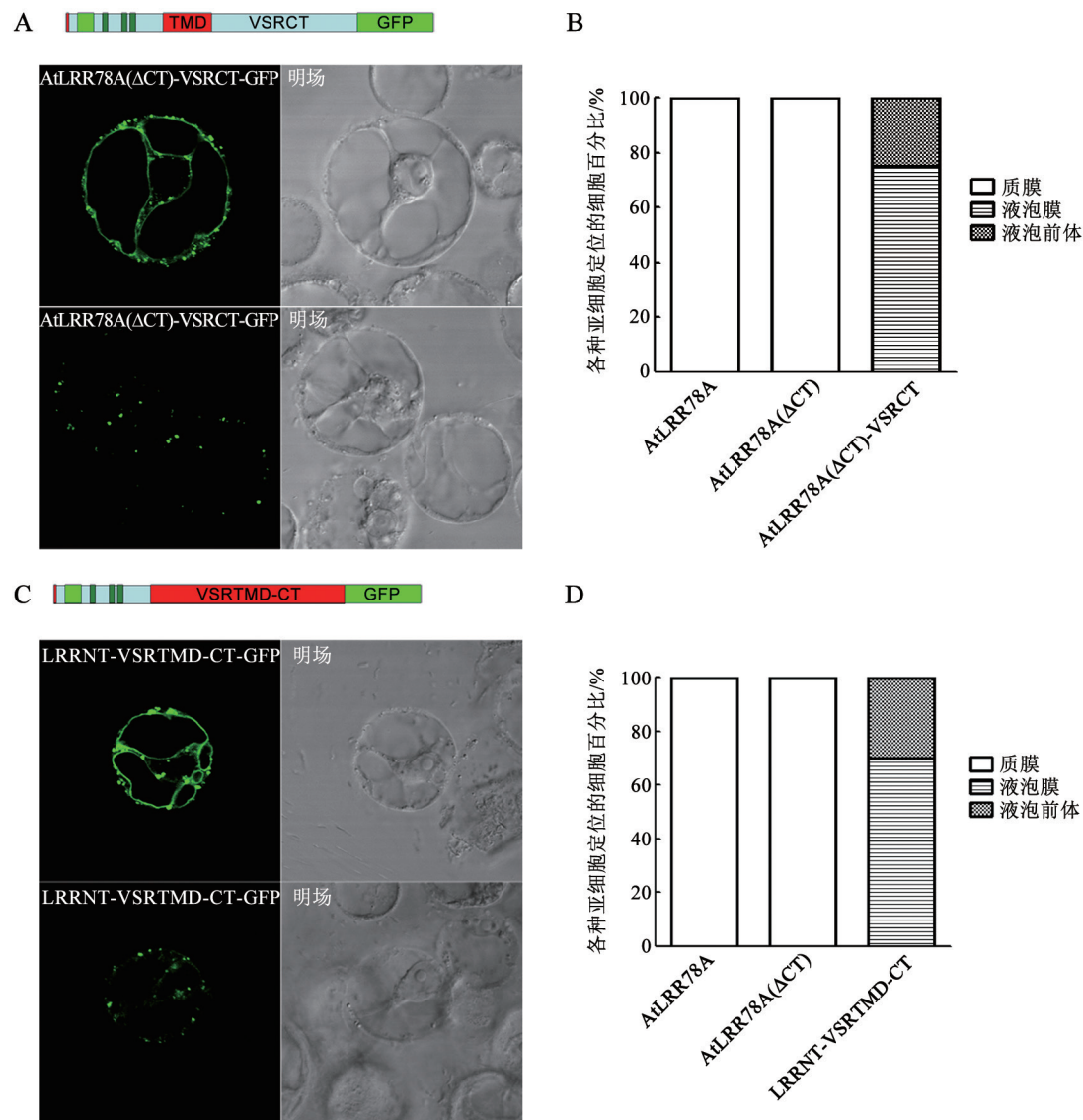


图8 LRRNT可以引导AtVSR2蛋白从PVC转位到液泡膜, AtVSR2的CT可以引导AtLRR78A蛋白进入PVC和液泡途径
Fig.8 LRRNT could guide AtVSR2 protein translocation from PVC to tonoplast, and only CT of AtVSR2 could guide AtLRR78A protein from PM to PVC and tonoplast pathway

A: AtVSR的CT可以引导质膜定位的AtLRR78A(ΔCT) (即LRRNT-TMD)蛋白进入PVC和液泡; B: 各种亚细胞定位的细胞所占百分比; C: LRRNT可以引导PVC定位的AtVSR2转位到液泡膜; D: 各种亚细胞定位的细胞所占百分比。

拣运输过程中的细胞学功能。我们发现: 该蛋白在内质网上合成, 然后经过高尔基体加工修饰, 可以从TGN分泌到质膜和PVC中, 抑或通过质膜转位到TGN然后到PVC中。经BFA处理的结果表明该蛋白在质膜和胞内细胞器中进行循环运输, 阐明了受体激活后在细胞内发生信号转导的过程, 而信号的终结也通过受体蛋白被运送到液泡中降解来实现。12 h后就观察到部分受体蛋白在液泡中降解也表明了信号转导及终结过程的高效快速。

在构建了缺失N端以及缺失C端的AtLRR78A表达载体后我们发现, 缺失N端会使AtLRR78A产生内质网定位的现象, 这表明蛋白的N端结构域在亚细胞定位过程中至关重要(图7)。进一步将AtLRR78A的N端结构域连接到AtVSR2上时, 原本定位在PVC的AtVSR2在绝大多数的细胞中都转位到了液泡膜上(图8), 表明AtLRR78A N端的信号序列对蛋白分选到液泡膜起引导的作用。

此外, 将AtVSR2的C端连接到缺失C端的AtL-

RR78A(Δ CT)上时, 定位在质膜的AtLRR78A(Δ CT)绝大多数转位到了液泡膜上, 这表明AtVSR2的C端含有使蛋白到达液泡的信号序列。因此, LRR-RLK的N端和AtVSR2的C端都含有极其重要的信号序列, 引导蛋白的正确定位。在去除AtLRR78A的C端后, 其亚细胞定位并没有发生变化, 这表明C端结构域对蛋白的亚细胞定位没有影响, 其只是受体通过磷酸化发生信号传递的区域。

LRR-RLK在细胞中的定位角色的阐明将有助于我们详细了解激酶受体的生理功能以及在信号传递过程中具体的分子生物学机制, 使我们在分子水平对生命活动的基本过程有更加清晰的认识。

参考文献

- Bücherl CA, van Esse GW, Kruijs A, Luchtenberg J, Westphal AH, Aker J, van Hoek A, Albrecht C, Borst JW, de Vries SC (2013). Visualization of BRI1 and BAK1(SERK3) membrane receptor heterooligomers during brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*, 162: 1911–1925
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 89: 575–585
- Cui Y, Zhao Q, Gao C, Ding Y, Zeng Y, Ueda T, Nakano A, Jiang L (2014). Activation of the Rab7 GTPase by the MON1-CCZ1 complex is essential for PVC-to-Vacuole trafficking and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26: 2080–2097
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006). Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 715–730
- Emans N, Zimmermann S, Fischer R (2002). Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell*, 14: 71–86
- Geldner N, Hyman DL, Wang XL, Schumacher K, Chory J (2007). Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev*, 21: 1598–1602
- Geldner N, Hyman DL, Wang XL, Schumacher K, Chory J (2007). Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev*, 21 (13): 1598–1602
- Gifford ML, Robertson FC, Soares DC, Ingram GC (2005). ARABIDOPSIS CRINKLY4 function, internalization, and turnover are dependent on the extracellular crinkly repeat domain. *Plant Cell*, 17: 1154–1166
- Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 1155–1163
- Hanton SL, Matheson LA, Brandizzi F (2006). Seeking a way out: export of proteins from the plant endoplasmic reticulum. *Trends Plant Sci*, 11: 335–343
- Hanton SL, Matheson LA, Chatre L, Rossi M, Brandizzi F (2007). Post-Golgi protein traffic in the plant secretory pathway. *Plant Cell Rep*, 26: 1431–1438
- Kobe B, Deisenhofer J (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 19: 415–421
- Lam SK, Siu CL, Hillmer S, Jang S, An G, Robinson DG, Jiang L (2007). Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, *trans*-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell*, 19: 296–319
- Lam SK, Tse YC, Jiang L, Oliviusson P, Heinzerling O, Robinson DG (2005). Plant prevacuolar compartments and endocytosis. *Plant Cell Monogr*, 1: 37–61
- Miao Y, Li KY, Li HY, Yao X, Jiang L (2008). The vacuolar transport of aleurain-GFP and 2S albumin-GFP fusions is mediated by the same pre-vacuolar compartments in tobacco BY-2 and *Arabidopsis* suspension cultured cells. *Plant J*, 56: 824–839
- Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2005). Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 1105–1119
- Phillipson BA, Pimpl P, daSilva LLP, Crofts AJ, Taylor JP, Movafeghi A, Robinson DG, Denecke J (2001). Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell*, 13: 2005–2020
- Pimpl P, Hanton SL, Taylor JP, Pinto-daSilva LL, Denecke J (2003). The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell*, 15: 1242–1256
- Pimpl P, Movafeghi A, Coughlan S, Denecke J, Hillmer S, Robinson DG (2000). In situ localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles. *Plant Cell*, 12: 2219–2236
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 20: 537–542
- Robinson DG, Albrecht S, Moriysu Y (2004). The V-ATPase inhibitors concanamycin A and bafilomycin A lead to Golgi swelling in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 224: 255–260
- Serrano M, Robatzek S, Torres M, Kombrink E, Somssich IE, Robinson M, Schulze-Lefert P (2007). Chemical interference of pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses in *Arabidopsis* reveals a potential role for fatty-acid synthase type II complex-derived lipid signals. *J Biol Chem*, 282: 6803–6811
- Takano J, Miwa K, Yuan L, von Wirén N, Fujiwara T (2005). Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 12276–12281
- Teis D, Wunderlich W, Huber LA (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell*, 3: 803–814
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 410: 380–383
- Xu SL, Rahman A, Baskin TI, Kieber JJ (2008). Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 3065–3079

The localization and trafficking mechanism of AtLRR78A, a leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) in *Arabidopsis*

WANG Yuan, WANG Xiao-Kun, GE Hai-Man, YANG Lei*

School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: Leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs), consisted of an extracellular LRR and intracellular Ser/Thr kinase domain, act as extracellular signal receptors and participate in perception and transmission of various environmental and developmental signals. So far, almost all the reports show that LRR-RLKs are localized at the plasma membrane, but the detail mechanisms of LRR-RLK protein trafficking are still unclear. Here, we analyzed a kind of typical LRR-RLK protein, which localized at plasma membrane and involved in *trans*-Golgi network (TGN), pre-vacuolar compartment (PVC) and vacuolar traffickings. N-terminal (NT) of LRR-RLK played an important role in formation of plasma membrane localization, and C-terminal (CT) was not required for plasma membrane localization. At the same time, NT could guide AtVSR2 protein translocation from PVC to tonoplast, and only CT of AtVSR2 could guide LRR protein from PM to PVC and tonoplast pathway in this study.

Key words: LRR-RLKs; AtLRR78A; plasma membrane; protein trafficking

Received 2016-10-31 Accepted 2017-02-05

This work was supported by the Youth Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (Grant No. BK2012306).

*Corresponding author (E-mail: leiyang@nju.edu.cn).