



植物受体激酶 BAK1 研究进展

田 荣, 杨 勇, 王晓峰*

(西北农林科技大学 园艺学院 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨陵 712100)

摘 要:植物受体激酶 BAK1 在多个信号转导路径上独立的多角色功能, 成为拟南芥受体激酶 610 个成员中最受关注的成员之一。BAK1 是一个典型的富亮氨酸重复序列的跨膜受体激酶, 属于 LRR-RK II 家族, 在结构上由胞外结合域、跨膜区以及胞内激酶结构域三部分构成。最初 BAK1 被鉴定为 BRI1 和 FLS2 的双元受体, 分别参与调控植物油菜素内酯 BR 的信号转导及病原相关模式分子 PAMPs 引发的免疫反应, 近期又有多个 BAK1 的互作组分被相继发现, 如 EFR、AvrPto、PEPR1/2、PUB13、BIR1、BON1 等。该文从 BAK1 的分子结构, BAK1 所在 SERKs 家族的功能冗余, 对油菜素内酯路径的信号调控, 参与病菌识别防御反应的先天免疫和调控细胞凋亡等方面对近年来国内外的相关研究进展进行综述, 以明确目前研究所面临的问题。

关键词:受体激酶; BR 信号; 先天免疫; 细胞死亡; BAK1

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Research Progress on BAK1 of a Receptor Kinase

TIAN Rong, YANG Yong, WANG Xiaofeng*

(College of Horticulture & State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Receptor kinase BAK1 (BRI-Associated Kinase 1) has been highlighted among all of 610 RKs of *Arabidopsis thaliana* because it played different independent roles in multiple signal transduction pathways. BAK1 is a typical leucine-rich repeats receptor kinase (LRR-RK) that belongs to the LRR-RK II family and structurally composed with three parts named extracellular domain, transmembrane domain and intracellular kinase domain. BAK1 was firstly identified as a dual co-receptor of BRI1 and FLS2, mediating BR signaling and pathogen-associated molecular pattern (PAMP) triggered immunity (PTI) in plant, respectively. Additionally, a set of new BAK1-interaction protein components, such as EFR, AvrPto, PEPR1/2, PUB13, BIR1, BON1, have been uncovered recently. This work has comprehensively reviewed the recently research progress on the molecular structure of BAK1, function-redundance of SERK, the role of BAK1 involving in BR signaling and PTI, as well as cell death, and expectively to clarify the research questions presently faced.

Key words: receptor kinases; BR signaling; innate immunity; cell death; BAK1

BAK1 是 2002 年黎家等^[1]通过激活标签筛选突变体与 Nam 等^[2]使用酵母双杂交筛选油菜素受体 BRI1 (BR insensitive 1) 的互作蛋白同时发现的

在油菜素信号路径上有重要功能的一个组分。BAK1 (At4g33430) 编码一个由 615 个氨基酸组成的蛋白, 是一个典型的植物受体激酶 (receptor ki-

收稿日期: 2013-11-22; 修改稿收到日期: 2014-01-19

基金项目: 国家自然科学基金 (C120106)

作者简介: 田 荣 (1987—), 女, 硕士, 主要从事蔬菜学研究。E-mail: sweetishtr@163.com

* 通信作者: 王晓峰, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜育种与分子生物学研究。E-mail: wangxf99@yahoo.com

nase),由胞外域、跨膜域及胞内激酶结构域组成。研究发现 BAK1 是油菜素受体 BRI1 的共受体,BAK1 与 BRI1 在油菜素的诱导下形成复合物,通过磷酸化激活相应的激酶活性,启动信号向下游传递。随后通过免疫共沉淀的方法发现 BAK1 与 FLS2 能形成复合物参与调控植物的先天免疫反应,并且复合物的形成依赖于细菌鞭毛蛋白 flg22 的诱导^[3]。近年来,相继发现 BAK1,与促动蛋白 AvrPto 和 AvrPtoB 相互作用,启动植物的病原菌防御反应^[4];与 BIR1 互作负向调控植物细胞死亡^[5];与 BON1 互作调控依赖于温度的植物生长和细胞死亡^[6];与 BIK1 及泛素连接酶 PUB12、PUB13 相互作用抑制植物先天免疫反应^[7]。由此看来,BAK1 是一个多功能受体,并不具备独立受体功能,而是以 BAK1 为核心形成了一个互作网络,各组分相互作用共同调控植物的生长发育及免疫反应。目前,BAK1 在各信号通路中的信号是如何分流,与各组分互作的分子机制尚不清楚,弄清 BAK1 发挥作用的分子机理对植物的生长发育及抗病抗逆调控具有重要实践意义。

1 受体激酶 BAK1 结构

植物受体激酶(RKs)是植物体内普遍存在的一类蛋白激酶,是许多信号识别传递途径中的关键组分,拟南芥基因组大约有 610 个 RK 基因编码的受体激酶,其中 LRR-RKs 是植物中最大的一类跨膜受体激酶,已报道的 LRR-RKs 共有 16 个家族,其中 LRR-RK II 家族共有 14 个成员,含 5 个 SERKs 家族体细胞胚胎发生蛋白激酶,BAK1/SERK3 为其一成员^[8]。目前研究较为深入的 LRR-RK 有油菜素 BR 受体 BRI1^[9],分生组织中平衡细胞增殖及分化的 CLV1^[10],调控叶片保卫细胞数目的 ER-ACT^[11],参与生物逆境中免疫防疫反应的 FLS2^[12]。BAK1 是近年来植物界受体激酶研究的一个热点,其结构功能研究较为清楚^[2]。BAK1 具有典型的膜激酶受体结构,由 N 端信号肽(N-terminal signal peptide,SP)、亮氨酸拉链结构(leucine zipper, LZ)、5 个 LRRs (leucine-rich repeats, LRRs)、富含脯氨酸区域(proline-rich region, pro-rich)、跨膜区域(single-pass transmembrane region, TM)以及胞内的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域(cytoplasmic serine/threonine kinase domain, KD)构成,如图 1 所示,胞外结构域主要负责感知胞外信号,跨膜区将胞外信号传递至胞内,胞内激酶结

构域负责将信号传递到下游。BAK1 的晶体结构的研究也相继展开^[13-14],这对研究其功能提供了重要帮助。

可逆的磷酸化与去磷酸化反应是 BR 信号转导的主要调控方式。在研究 BRI1 和 BAK1 相互作用机制时,发现 BRI1 与 BAK1 具有催化丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸磷酸化的双重激酶活性,通过质谱(MS)鉴定出了它们激酶结构域的磷酸化位点^[15-16]。目前已经鉴定出的 BAK1 胞内域共 10 个磷酸化位点,如图 1 所示,其中 6 个(S290、T312、T446、T449、T455、W610^[17])在体内磷酸化,4 个在体外磷酸化(S286、T450、S604、S612)。BAK1 的磷酸化主要发生在激发环(T446、T449、T450、T455)上,最近也鉴定到了 CT 末端的 3 个磷酸化位点(S604、W610、S612)。BAK1 激发环上的 T455 对应于 BRI1 T1049, T455 残基的磷酸化在其功能发挥中是必需的,因为将 T455 突变为非磷酸化丙氨酸残基 A 以后,激酶活性丧失。尽管激发环上其他磷酸化位点的单突变对 BAK1 的活性没影响,但将所有 3 个 Thr 突变为 Ala(T446A/T449A/T450A)后激酶活性也会丧失,预示激发环的磷酸化对 BAK1 的激酶活性至关重要,BAK1 磷酸化这些残基后,可能就激活了 BAK1。BAK1 磷酸化位点改变能引起了 BAK1 激酶活性和转基因植株表型的显著改变,说明 BAK1 特异位点磷酸化对植株的生长发育进程具有重要调控作用^[18-19]。这一受体在 BR 信号及免疫反应中功能的分化,是否因不同的磷酸化水平导致下游信号的特异性,是否在不同信号路径中存在着竞争,其分子机理有待进一步挖掘。近年来相继鉴定出 BAK1 的一系列突变体,如图 1 所示。黎家等^[1]通过 T-DNA 插入法鉴定了 BAK1 缺失突变体 *bak1-1* 和 *bak1-2*,该突变体植株矮小,莲座叶紧缩,并对 BR 敏感度降低,类似于 *bri1* 弱突变的表型。Kemmerling 等^[20-21]通过 T-DNA 插入法鉴定了 BAK1 突变体 *bak1-3* 和 *bak1-4*,该突变体不仅对 BR 敏感度降低,PTI 信号路径也被抑制,用人工合成细菌鞭毛蛋白肽段 flg22 处理后,*bak1-3*,*bak1-4* 在幼苗期 ROS 显著增加,相对生长量均减小,并由此发现 BAK1 与 FLS2 在 flg22 的诱导下能形成复合物,参与调控植物的先天免疫反应;用毒性病原菌 *Pto* DC3000 侵染 *bak1-3*, *bak1-4* 突变体植株,*bak1-3*,*bak1-4* 表现出严重感病现象,由此证明 BAK1 控制细胞死亡,并独立于 BR 信号^[22]。*bak1-5* 是 Schwessinger 等^[23]鉴定的一个点突变体 *bak1-*

5(C408Y)表现出正常的 BR 信号,但 PTI 信号通路被严重损坏,接种 *Pto* DC3000 后,*bak1-5* 比易感病的 *efr-1fls2* 更易感病,故 *bak1-5* 通常被用来研究 BAK1 在 PTI 信号的特异性。*bak1-6* 是最近 Gou 等^[24] 鉴定的一个 T-DNA 插入突变体,同样该突变体对 BR 不敏感,在 PTI(pathogen associated molecular pattern-triggered immunity)信号中的作用尚不清楚。*elg* 是在第四个外显子处 D122N 突变的一个点突变体,由于与 BRI1 的高亲和力,使得其 BR 信号被增强^[25-26]。通过对突变体的研究,进一步增强了 BAK1 在不同信号通路中的作用如先天免疫,病原菌防御,细胞死亡等方面的作用更具说服力。

2 BAK1 与 SERK 家族其他成员的重叠作用

体细胞胚胎发生受体蛋白激酶(somatic embryogenesis receptor kinases, SERKs)属于富亮氨酸重复序列受体蛋白激酶(leucine-rich repeat sequence receptor kinase, LRR-RK)家族的第二亚类,在许多生理过程中有重要的调节作用,如体细胞胚发生、小孢子分化发育、花序结构、维管组织分化、油菜素内酯信号通路、花器官去木质化、细胞死亡调控和防御反应等^[27-28]。最初在胡萝卜中鉴定得到了

SERK1 基因,由于与胡萝卜体细胞胚胎发生密切相关,因此被命名为体细胞胚胎发生相关受体蛋白激酶(SERK)基因^[29],随后在多个物种如玉米、水稻、小麦等中克隆到了 SERK 基因,在拟南芥中通过序列同源性克隆到 5 个 SERK 基因,分别是 *SERK1*、*SERK2*、*SERK3/BAK1*、*SERK4/BKK1/BAK7*、*SERK5*^[30]。

SERK1 参与调控植物的胚胎发生及雄性孢子的产生,研究发现拟南芥 *serk1* 或 *serk2* 单突变体与野生型没有表型差异,其孢子发育正常,但 *serk1serk2* 双突变体表现出小孢子败育,*SERK1* 和 *SERK2* 蛋白可在体内形成同型或异型二聚体,说明 *SERK1* 和 *SERK2* 作为控制孢子体分化而影响雄配子体发育的受体激酶功能是重复的^[31-32]。在寻找 *SERK1* 活体互作组分时,通过 LC/MALDI-TOF/MS 及免疫共沉淀的方法鉴定出 *SERK1* 与 *BRI1*、*BAK1*、*KAPP*、*CDC48A*、*14-3-3* 存在互作^[33]。研究发现 *BAK1/SERK3* 和 *SERK1* 共同参与调控 BR 信号,和 *BAK1* 一样,过表达 *SERK1* 或 *BKK1* 都能部分抑制 *bri1-5* 的表型,虽然 *bak1* 功能缺失单突变只有比较弱的矮化表型,但 *bak1 serk1* 双突变的 BR 不敏感的矮化表型显著增强^[34]。有人提出,*SERK1* 和 *BAK1/SERK3* 一起,而不是和 *BKK1/SERK4* 共同介导对 BR 的响应,*SERK* 家族成员都是由于

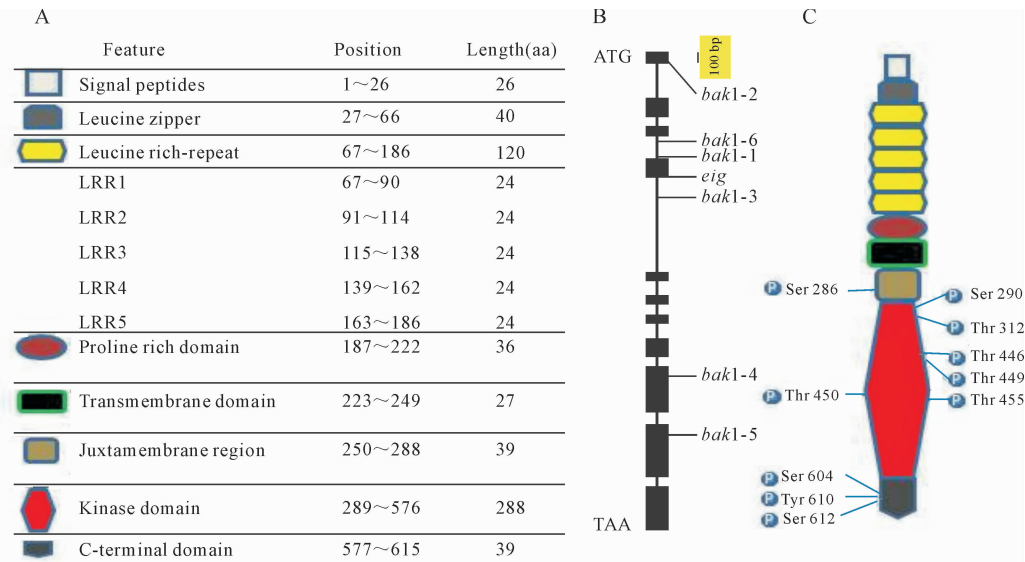


图 1 BAK1 激酶结构

A. BAK1 不同结构区域所对应的氨基酸位点及区段长度;B. BAK1 基因结构图及对应 BAK1 突变体;C. BAK1 蛋白结构图及已鉴定的磷酸化位点

Fig. 1 The structure of receptor-like kinase BAK1

A. The table indicates each region of BAK1 and corresponding amino acid position and length;B. The gene structure of BAK1 and related BAK1 mutants;C. The basic structure of BAK1 and identified phosphorylation sites

基因拷贝而产生,在功能上存在冗余,但在进化中又有功能特异性的分化,使得分析更为复杂。

BAK1 和其同源基因 BKK1(SERK4),参与控制光依赖性细胞死亡过程^[22]。*bak1-4 bkk1-1* 双突变体表现出光下的幼苗致死表型,细胞自发死亡。在 *bak1-4 bkk1-1* 双突变中能观察到细胞死亡表型的多个方面,包括防御相关基因表达水平的上调和 H₂O₂ 的积累,但在每个基因的单突变和 *bri1* 无义突变体中却没有这种现象。这就暗示 BAK1 和 BKK1 在抑制不依赖于 BR 信号的细胞死亡通路中起着冗余的作用,两者具有双重生理功能,正调控依赖于 BR 的植物生长途径,负调控独立于 BR 的细胞凋亡途径。综合起来,BAK1 和 SERK 家族其他成员在不同的途径中起着相互重叠的作用。BAK1/SERK3、SERK1 和 BKK1/SERK4 在 BR 信号通路中起作用,BAK1/SERK3 和 BKK1/SERK4 在细胞死亡控制中起作用。目前对 SERK5 的研究相对较少,各成员是如何共同调控不同的生理功能,其机理还有待于深入研究。

3 BAK1 参与调控 BR 信号

油菜素内酯被认为是植物界的第六大植物激素,是 1970 年美国科学家 Mitchell 从油菜花粉中分离得到的一种甾醇类物质,对植物种子的萌发,茎的伸长,叶片的开展,木质部的分化,植物育性,抗病及抗逆等方面具有重要作用^[35-36]。BRI1 是定位于细胞膜上的富含亮氨酸重复序列的受体激酶,它的胞外区域含有 25 个 LRRs,在第 21 个和第 22 个 LRR 之间有一个由 70 个氨基酸组成的“岛屿(island)”结构,后来被鉴定为油菜素 BR 的结合区域。*bri1* 不敏感突变体表现出植株矮小,莲座叶紧凑,叶色深绿卷曲,由于过表达 BAK1 能部分恢复 *bri1* 突变体的表型,由此发现 BAK1 参与调控 BR 信号,并且 BAK1 在体内外都能与 BRI1 形成异源二聚体,且二聚体的形成依赖于油菜素的诱导^[37-38];同时,黎家^[1]通过 T-DNA 插入法鉴定了 *bak1-1* 和 *bak1-2* 突变体,该突变体表现类似于 *bri1* 弱突变体,植株矮小,莲座叶紧凑,并且对 BL 的敏感程度降低,进一步通过免疫沉淀法证明 BAK1 能与 BRI1 形成复合物^[38]。BAK1 与 BRI1 均在植物体内广泛表达,是定位于质膜上的膜蛋白^[37]。BAK1 作为 BRI1 在 BR 信号通路中的共受体,共同参与调控植物的生长发育。在没有 BRs 诱导时,BRI1 激酶活性除了受自身 C 端区域的抑制之外,还受 BKI1(BRI1 Ki-

nase Inhibitor 1) 的负调控,BKI1 定位于质膜上^[39-40],与 BRI1 相互作用,抑制 BRI1 激酶活性;在 BRs 诱导时,BR 与 BRI1 的结合使其磷酸化激活,活化的 BRI1 将 BKI1 解离到细胞质中,被释放的 BRI1 与 BAK1 以顺序磷酸化(sequential transphosphorylation)的模型激活下游信号的传递^[16];BRI1 的自磷酸化激活自身活性,与 BAK1 结合后,将 BAK1 部分磷酸化位点(S290/T312/T446/T449/T450/T455)磷酸化,激活 BAK1,激活状态的 BAK1 反过来又将 BRI1 一些位点磷酸化,完全激活其活性,活化的 BRI1 依次磷酸化激活 BSK1(BR-Signal Ling Kinase 1)^[41]和 BSU1(Bri1 Suppressor 1),活化的 BSU1 将 BIN2(Brassinosteroid Insensitive 2)去磷酸化使其失活,解除 BIN2 对转录因子 BES1(Bri1-EMS-Suppressor 1)^[42]/BZR1(Brassinazole-Resistance 1)^[43]的抑制功能。PP2A(Protein Phosphatase 2A)^[44]可以将 BES1/BZR1 去磷酸化激活,也可以将受体 BRI1 去磷酸化促使其降解,终止 BR 信号。在该信号通路中 BAK1 仅将 BRI1 激活,并不参与下游信号的传递。过量表达 BAK1 可以互补弱的突变体 *bri1-5*(胞外域含有一个氨基酸位点突变)的表型,但是不能互补 *bri1-4*(激酶域丧失功能的突变体)的表型,说明 BAK1 与 BRI1 存在功能上的互补,并且这种互补需要 BRI1 激酶的活性。BAK1 定位在质膜上,但在后来的研究中发现 BAK1 同样存在于胞内体(endosome),BAK1 同 BRI1 一样具有内吞现象,并且 BRI1 和 BAK1 在原生质体中的共表达会加速其内吞^[37,45],目前 BAK1 内吞至内膜被降解或回到质膜上被循环再利用维持平衡的具体机理尚不明确。

4 BAK1 与植物先天免疫

植物很大程度上依靠其先天免疫系统来抗衡各种微生物的入侵,在植物界中有两种先天免疫反应,即 PTI(PAMP-triggered immunity)和 ETI(effector-triggered immunity)。PTI 是植物通过细胞表面模式识别受体 PRRs 识别 PAMPs 如 flg22, elf18,即 PAMP 引发的免疫(PTI),通常被称为是植物防御反应的第一道防线;ETI 是效应蛋白引发的一种免疫反应,主要发生在细胞内,植物通过特异蛋白识别毒性蛋白,从而启动植物的防御反应,抑制病原菌的产生,限制其扩散,也被称为防御反应的第二道防线^[46-47]。植物体内 BAK1 同时参与 PTI 及 ETI 反应,不仅是许多 PAMPs 识别受体 PRR 的共

受体,同时也是许多效应蛋白的靶向蛋白,参与调控 ETI 反应,由此说明,BAK1 在植物的病菌防御反应及免疫反应中发挥重要作用^[48]。

FLS2(flagellin-sensitive 2)^[3,12] 和 EFR(elongation factor tu)^[49] 是两个研究较为清楚的模式识别受体 PRRs,属于植物受体激酶(RK),是一种跨膜蛋白,有 N 端胞外配基结合域,跨膜区及胞内 C 端激酶结构域组成,参与调控植物的多重生理过程,包括植物生长发育、抗病防御以及微生物感染引起的免疫反应。FLS2 和 EFR 分别识别 22 个氨基酸肽段的细菌鞭毛蛋白 flagellin(fl g22)和细菌延长因子(EF-Tu)。bak1-4 在用 fl g22 处理后,植株根生长正常,并没有表现出野生型应有的抑制作用,活性氧 ROS 积累量也显著低于野生型,由此发现 BAK1 参与到 fl g22 引发的防御反应。Chinchilla 等通过免疫共沉淀的方法证实了 BAK1 能与 FLS2 形成复合物,并且依赖于 fl g22 的诱导。BAK1 的转录水平会随着各种 PAMPs 如 fl g22 的处理而上调,植物识别 fl g22 后,在较短时间甚至是几秒内,BAK1 和 FLS2 形成异源二聚体,将 FLS2 下游底物 BIK1 (Botrytis-Induced Kinase 1)磷酸化,启动植物的天然免疫反应^[50-51],这些结果显示 BAK1 在鞭毛蛋白信号途径中能作为 FLS2 的共受体。

部分强病原菌不能被细胞表面的模式识别受体识别,而是通过保守的Ⅲ型分泌系统结构穿透植物细胞壁,将大量效应蛋白分子分泌到植物细胞内,部分效应蛋白能被寄主细胞内特定的抗性蛋白识别而激活更为剧烈的免疫反应即 ETI。AvrPto 和 AvrPtoB^[52] 就是两个典型的分泌型蛋白,来源于丁香假单胞菌致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pst*),它们通过阻断宿主植物的防卫系统来增强毒性,为抵御这种侵害,植物也形成了具有高度特异性的信号组分,如 BAK1,它能识别出毒性蛋白,限制其感染,限制方式即通过诱导局部化的细胞死亡来发挥作用。研究发现,BAK1 能与 AvrPto 和 AvrPtoB 形成复合物,并且 BAK1 的跨膜区及胞内激酶域对 BAK1-AvrPto 复合体的形成具有重要作用,AvrPto 会阻止 flagellin 诱导的 BAK1-FLS2 复合体的形成,同时也阻止寄主依赖于 BAK1 的各种 PAMPs 和 BR 信号的免疫反应^[6]。这些发现揭示了细菌病原菌产生的一种独特的机制即有毒性的促动因子主要通过 PAMP-受体复合物来阻止信号向下游的传递。过表达细菌效应蛋白 AvrPto 的转基因植株具有与 *bri1* 弱突变体相似的矮小表型,以此

为线索,发现 AvrPto 和 AvrPtoB 能与 BAK1 形成复合物,导致 FLS2-BAK1 结合的瓦解,同时抑制 BR 信号通路,但后来的研究表明 AvrPto 的靶向蛋白并不是 BAK1,而是直接靶向 FLS2,形成的 AvrPto-FLS2 复合体能阻止 FLS2 路径下游信号组分 BIK1 的磷酸化,从而阻止植物的防御反应^[53],三者到底是如何共同调控植物免疫反应的机制还有待进一步研究。

植物在遭受细菌过度入侵之后,其天然免疫系统必须关闭从而防止过度的免疫反应对植物的组织造成伤害,研究发现拟南芥中 PUB12 和 PUB13 能与 BAK1 形成复合物从而减弱植物先天免疫反应^[12]。PUB12/13 是典型的 E3 泛素连接酶,通过 BAK1 激活,它能靶向并降解天然免疫受体 FLS2,成功地避免对免疫系统的有害的组成性激活,它为宿主提供了一种如何完美地及时地调节免疫反应的机制。在酵母双杂交实验中以 BAK1 胞内激酶域为诱饵,筛选出 PUB12/13 两个典型的 U-box 蛋白。研究发现,与野生型植株相比突变植株 *pub12* 及 *pub13* 对 fl g22 诱导免疫反应增强,对 *Pto* DC3000 的抗性提高了 6~10 倍,由此看来 PUB12 和 PUB13 在天然免疫信号传导中起着负调控作用。Lu^[12] 通过免疫共沉淀的方法证明 fl g22 诱导 BAK1-FLS2、FLS2-PUB12/13、BAK1-PUB12/13 复合物的形成,BAK1-PUB12/13 复合物的形成需要 fl g22 的诱导。BAK1 直接磷酸化 PUB12/13,并且磷酸化依赖其激酶活性,BAK1 无激酶活性突变体 BAK1Km(K317E)不能磷酸化 PUB12/13。与 BAK1/FLS2 互作的激酶 BIK1,并不能磷酸化 PUB12/13,但是增强 BAK1 磷酸化 PUB12/13 的水平。PUB12/13 具有自泛素化活性,且能泛素化降解 FLS2,但是这种泛素化具有特异性,BAK1 及 BIK1 均不能被其泛素化,有研究报道 fl g22 能诱导 FLS2 的内吞形成囊泡,但不能诱导 FLS2 突变体 Thr867 内吞,但是该突变体仍能正常被泛素化降解,似乎表明内吞及泛素化是两个独立的过程^[54]。这一研究表明 PTI 的强度可通过 BAK1/FLS2 复合物中 FLS2 的降解来调控,BAK1 似乎是多个信号途径的一接头信号分子,目前其调控机理尚不明确。

2011 年 Albrecht 等^[55] 报道通过 BRs 激活的 BAK1 并不能引发相应的免疫反应,如活性氧 ROS 的增加,PTI 标志基因的表达量上调;通过 PAMP 的识别激活的 BAK1 也不能调节 BR 反应,BR 抑制 PAMP 引发的免疫反应独立于 BAK1,而 FLS2 调

控制的免疫反应依赖于 BAK1,这就表明 BAK1 并不是 BR 信号与 FLS2 途径的限速因子。2011 年 Belkhadir 等^[25]报道拟南芥中过表达 BRI1 抑制依赖于 BAK1 的免疫反应,而对独立于 BAK1 的免疫反应没有影响,表明 BRI1 同其他 MAMP 受体竞争与 BAK1 互作,同时,文章强调 BR 信号和免疫反应的协同作用需要 BAK1,这表明 BAK1 参与的 BR 信号及免疫反应之间存在复杂的交叉作用,两者分别从不同的角度给出了不同的解释,但具体机理还有待深入研究。

FHA 域是多个信号蛋白包括拟南芥的 KAPP (kinase-associated protein phosphatase)^[56] 的磷酸苏氨酸识别区域,调控被丝氨酸或苏氨酸磷酸化的蛋白与磷酸肽的互作,KAPP 的激酶互作区(KI-FHA)作为一个负调控因子调控许多受体激酶信号途径中植物的生长及环境响应。在鉴定 KI-FHA 的潜在结合位点时,通过核磁共振和滴定量热法发现 BAK1 和 KAPP 的 KI-FHA 结合,体外实验对苏氨酸位点突变发现 BAK1 激酶域 C 臂的 Thr546 是一个主要但不是唯一的 KI-FHA 结合位点。KAPP 还在 BR 信号通路中与 BRI1 互作,参与调控植物的生长发育。

植物除了能免受外源 PAMPs/MAMPs 的入侵,也能抵抗内源激发子 DAMPs 的侵害,在研究免疫相关的 RK 基因表达过程中,发现了 BAK1 的另两个互作组分 PEPR1 及其同源物 PEPR2^[57]。PEPR1 属于 LRR-RK,识别一个伤害诱导产生的内源肽段 AtPEP1,AtPEP1 能引发植物的天然免疫反应,增强植物对细菌感染的抗性。通过酵母双杂交试验发现 BAK1 和 PEPR1,PEPR2 互作,参与植物的生长发育调控及免疫反应。有研究正进一步证实是否 AtPEP1 诱导的胞内反应如细胞质内钙离子水平的增高,氯离子通道的激活可以让细胞膜去极化,是依赖于活体中 PEPR1 和 BAK1 复合物的形成。

5 BAK1 与植物细胞死亡

BAK1 与其同源物共同调控细胞死亡途径。通过对 BAK1 突变体 *bak1-3*,*bak1-4* 的研究^[21] 发现 BAK1 参与植物细胞死亡调控,并且独立于 BR 信号,对 *bak1-3*,*bak1-4* 接种 Pto DC3000,均有坏死斑出现,甚至有死亡迹象,外源喷施 BL,仅能恢复突变体的生长缺陷,并没减轻病菌感染程度,由此说明 BAK1 调控的细胞死亡独立于 BR 信号。BAK1/

AtSERK3 还与其同源物共同调控细胞死亡^[22],最初报道 BAK1 及其同源物 AtSERK4/BKK1 存在功能冗余,*bak1-4/bkk1-1* 的双突变体表现出幼苗致死现象,*bak1-4/bkk1-1* 双突变体在早期生长量减小,并且由于产生过多的 ROS 及 PR 基因的过表达,使得在幼苗期死亡,但 *bak1*,*bkk1* 并不表现死亡症状,预示着 BAK1 和 BKK1 共同调控独立于 BR 信号的细胞死亡信号。Jeong 等^[20] 构建了一个 BAK7 RNAi 载体,BAK7 对应于 AtSERK4/BKK1,BAK7 RNAi 转基因植株也表现出生长量减小,幼苗致死,并早衰。由此,控制细胞死亡被认为是 BAK1 及其同源物的一个独立且极为重要的功能。

在后来筛选到的 BAK1 互作组分中发现 BAK1 能与多个组分共同作用调控植物的细胞死亡。2009 年 Gao 等^[5] 通过反向遗传学法筛选到一个 T-DNA 插入突变体 *bir1*,在 22 °C 时表现出幼苗死亡,由于其基因编码产物与 BAK1 互作,故命名为 BIR1(BAK1-interacting receptor-like kinase 1),BIR1 (At5g48380) 是定位在膜上的一个活性蛋白激酶,属于 LRR-RK X。通过 BIFC 及免疫共沉淀的方法证实了 BIR1 与 BAK1 在质膜上结合,负调控植物抗性。敲除 BIR1 导致植物细胞死亡,*bir1-1* 突变体在 22 °C 表现出幼苗致死的现象,表型与 *bak1/bkk1* 相似,并且这种死亡与生长环境温度密切相关。由于 BIR1 与 BON1

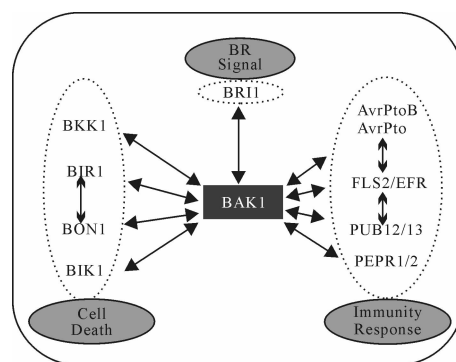


图2 BAK1 已鉴定互作组分

BAK1 参与调控多条信号途径:与 BRI1 共同调控 BR 信号;分别与 BKK1, BIR1, BON1 及 BIK1 互作调控植物细胞死亡;与 AvrPto/AvrPtoB, FLS2, EFR, PUB12/13, PEPR1/2 结合调控植物先天免疫反应

Fig. 2 Identified interactants of BAK1

BAK1 is involved in multiple signal transduction pathways, including BR signal with receptor kinase BRI1, cell death control with BKK1, BIR1, BON1 and BIK1, as well as innate immunity response with AvrPto/AvrPtoB, FLS2, EFR, PUB12/13, PEPR1/2, respectively

存在互作,后来发现 BAK1 与 BON1 也存在互作,并且 BON1 与 BIR1 相互调控彼此的表达水平,共同调控植株的生长及细胞死亡^[6]。拟南芥 BON1 基因编码钙依赖型磷脂结合蛋白,参与调控植物生长的内稳态及抗病性,通过酵母双杂交及双分子荧光互补(BiFC)技术证实了 BON1 与 BAK1 在体内外均互作,BON1 和 BIR1 都是 BAK1 的磷酸化底物,均能被 BAK1 在体外磷酸化。*bir1-1* 表现出类似 *bon1bon2* 和 *bon1bon3* 在 22 °C 时的细胞死亡和缺陷型,但在温度升为 28 °C 时,植株正常生长不再死亡,与 *bir1* 或 *bon1* 单突变比起来,*bir1bon1* 双突变幼苗致死现象更严重。在无病菌侵染时,BON1 抑制 R 基因的表达,负向调控 PAMP 及 R 蛋白引发的免疫反应。BAK1 与 FLS2 形成复合物启动 PTI 信号,在没有病原因子时又与 BON1 形成复合物抑制 ETI 信号,BAK1 同时调控细胞死亡及 PTI 与 ETI 的交互网络,目前其调控机理还不清楚,这一问题的阐释将对调控植物的生长及免疫反应具有实践意义。

6 讨 论

近十多年来,BAK1 是受体激酶领域研究的一个热点,从受体激酶结构、包括晶体结构到功能鉴定等方面都取得明显进展。BAK1 在 BR 信号通路中的作用机理研究的比较透彻,但在调控植物的生长发育,细胞死亡以及先天免疫等方面的作用机理还有待进一步挖掘。BAK1 在 SERKs 家族中与其他成员存在功能冗余,并且 SERKs 成员也参与调控

BR 信号,细胞死亡等,加上各组分交织的作用,使得遗传分析较为困难。BAK1 发挥功能并不是独立的发挥作用,而是和其他组分相互作用使其功能得以发挥。目前已鉴定的 BAK1 互作组分有 BRI1、BON1、BIR1、FLS2、EFR、PUB12/13、PEPR12/13、BIK1、AvrPto、AvrPtoB、KAPP 等,如图 2 所示,研究发现各组分之间也存在互作,形成了一个交互网络,BAK1 似乎是这一网络的核心组分,通过 BAK1 将各组分交织在一起,对植物的生长发育,抗病抗逆等方面发挥其调控作用。自 BAK1 磷酸化位点的鉴定,研究者试图从受体-复合物相互磷酸化方面研究其互作机理,并进一步揭示 BAK1 参与的信号转导的分子机理,但各信号通路的交互作用还不清楚。通过 BRs 和 PAMP 激活的 BAK1 分别调控不同的信号途径,两者没有交叉,但似乎存在一定的竞争,不同的受体相互竞争与 BAK1 形成二聚体,启动下游特异信号传递,有研究者认为是 BAK1 不同的位点磷酸化从而产生了下游信号的特异性,BAK1 的多功能角色是如何分配的,其分析较为复杂。研究人员观察到了 BRI1/BAK1 的内吞现象,BAK1 内吞降解或是回到质膜被循环利用维持动态平衡的分子机制仍属未知,这一问题的清楚阐释将对解释 BAK1 功能的分化具有重要意义。弄清 BAK1 调控植物生长发育、先天免疫及细胞死亡等方面的分子机理将对农作物 BAK1 基因功能的挖掘具有重要指导意义。相信在后续的研究中,借助新兴研究手段,所有问题将得到满意的阐释。

参考文献:

- [1] LI J, WEN J, LEASE K A, *et al.* BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, **110**(2): 213—222.
- [2] NAM K H, LI J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, **110**(2): 203—212.
- [3] CHINCHILLA D, ZIPFEL C, ROBATZEK S, *et al.* A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence[J]. *Nature*, 2007, **448**(7 152): 497—500.
- [4] SHAN L, HE P, LI J, *et al.* Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2008, **4**(1): 17—27.
- [5] GAO M, WANG X, WANG D, *et al.* Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in *Arabidopsis*[J]. *Cell Host & Microbe*, 2009, **6**(1): 34—44.
- [6] WANG Z, MENG P, ZHANG X, *et al.* BON1 interacts with the protein kinases BIR1 and BAK1 in modulation of temperature-dependent plant growth and cell death in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2011, **67**(6): 1 081—1 093.
- [7] LU D, WU S, GAO X, *et al.* A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, **107**(1): 496—501.
- [8] SHIU S H, BLEECKER A B. Plant receptor-like kinases gene family: diversity, function and signaling[J]. *Science Signaling*, 2001, (113):

re22.

- [9] LI J, CHORY J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involve in brassinosteroid signal transduction[J]. *Cell*, 1997, **90**(5): 929—938.
- [10] CLARK S E, WILLIAMS R W, MEYEROWITZ E M. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 1997, **89**(4): 575—585.
- [11] TORRI K U, MITSUKAWA N, OOSUMI T, et al. The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats[J]. *Plant Cell*, 1996, **8**(4): 735—746.
- [12] LU D, LIN W, GAO X, et al. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity[J]. *Science*, 2011, **332**(6 036): 1 439—1 442.
- [13] GAO J, MA Y, SUN Y, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Arabidopsis thaliana* BRI1-associated kinase 1 (BAK1) cytoplasmic domain[J]. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2012, **68**(3): 340—342.
- [14] YAN L, MA Y, LIU D, et al. Structural basis for the impact of phosphorylation on the activation of plant receptor-like kinase BAK1[J]. *Cell Research*, 2012, **22**(8): 1 304—1 308.
- [15] WANG X, GOSHE M B, SODERBLOM E J, et al. Identification and functional analysis of *in vivo* phosphorylation sites of the *Arabidopsis* brassinosteroid insensitive1 receptor kinase[J]. *The Plant Cell*, 2005, **17**(6): 1 685—1 703.
- [16] WANG X, KOTA U, HE K, et al. Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling[J]. *Development Cell*, 2008, **15**(2): 220—235.
- [17] OH M H, WANG X, WU X, et al. Autophosphorylation of Tyr-610 in the receptor kinase BAK1 plays a role in brassinosteroid signaling and basal defense gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, **107**(41): 17 827—17 832.
- [18] YUN H S, BAE Y H, LEE Y J, et al. Analysis of phosphorylation of the BRI1/BAK1 complex in *Arabidopsis* reveals amino acid residues critical for receptor formation and activation of BR signaling[J]. *Molecules and Cells*, 2009, **27**(2): 183—190.
- [19] SCHULZE B, MENTZEL T, JEHL A K, et al. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(13): 9 444—9 451.
- [20] JEONG Y J, SHANG Y, KIM B H, et al. BAK7 displays unequal genetic redundancy with BAK1 in brassinosteroid signaling and early senescence in *Arabidopsis*[J]. *Molecules and Cells*, 2010, **29**(3): 259—266.
- [21] KEMMERLING B, SCHWEDT A, RODRIGUEZ P, et al. The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control[J]. *Current Biology*, 2007, **17**(13): 1 116—1 122.
- [22] HE K, GOU X, YUAN T, et al. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell death pathways[J]. *Current Biology*, 2007, **17**(13): 1 109—1 115.
- [23] SCHWESSINGER B, ROUX M, KADOTA Y, et al. Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1[J]. *PLoS Genet*, 2011, **7**(4): e1002640.
- [24] GOU X, YIN H, HE K, et al. Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling[J]. *PLoS Genet*, 2012, **8**(1): e1002452.
- [25] BELKHADIR Y, JAILLAIS Y, EPPL P, et al. Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**(1): 297—302.
- [26] WHIPPO C W, HANGARTER R P. A brassinosteroid hypersensitive mutant of BAK1 indicates that a convergence of photomorphogenic and hormonal signaling modulates phototropism[J]. *Plant Physiology*, 2005, **139**(1): 448—457.
- [27] ZIPFEL C. Early molecular events in pamp-triggered immunity[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, **12**(4): 414—420.
- [28] DU J, YIN H, ZHANG S. Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid independent actions in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, **54**(6): 388—399.
- [29] SCHMIDT E D, GUZZO F, TOONEN M A, et al. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell competent to form embryos[J]. *Development*, 1997, **124**(10): 2 049—2 062.
- [30] HECHT V, VIELLE-CALZADA J P, HARTOG M V, et al. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture[J]. *Plant Physiology*, 2001, **127**(3): 803—816.
- [31] KARLOVA R, BOEREN S, RUSSINOVA E, et al. The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1[J]. *Plant Cell*, 2006, **18**(3): 626—638.
- [32] ALBRECHT C, RUSSINOVA E, KEMMERLING B, et al. Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid-dependent and-independent signaling pathways[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(1): 611—619.
- [33] KIM T W, WANG Z. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, **61**: 681—704.
- [34] KAUSCHMANN A, JESSOP A, KONCZ C, et al. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development[J]. *The*

- Plant Journal*, 1996, **9**(5): 701–713.
- [35] ULLAH H, CHEN J G, WANG S. Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination[J]. *Plant Physiology*, 2002, **129**(2): 897–907.
- [36] VERT G, NEMHAUSER J L, GELDNER N, *et al.* Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants[J]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005, **21**: 177–201.
- [37] RUSSINOVA E, BORST J W, KWAAITAAL M, *et al.* Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1)[J]. *The Plant Cell Online*, 2004, **6**(12): 3 216–3 229.
- [38] WANG X, LI X, MEISENHEDER J, *et al.* Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1[J]. *Developmental Cell*, 2005, **8**(6): 855–865.
- [39] WANG X, CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane[J]. *Science*, 2006, **313**(5 790): 1 118–1 122.
- [40] JAILLAIS Y, HOTHORN M, BEIKHADIR Y. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor[J]. *Genes & Development*, 2011, **25**(3): 232–237.
- [41] TANG W, KIM T W, OSES-PIRETO J A. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2008, **321**(5 888): 557–560.
- [42] YIN Y, WANG Z, MORA-GARCIA S. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation[J]. *Cell*, 2002, **109**(2): 181–191.
- [43] WANG Z, NAKANO T, GENDRON J. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis[J]. *Developmental Cell*, 2002, **2**(4): 505–513.
- [44] TANG W, YUAN M, WANG R, *et al.* PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, **13**(2): 124–131.
- [45] GELDNER N, JÜRGENS G. Endocytosis in signalling and development[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, **9**(6): 589–594.
- [46] BOLLER T, HE S. Innate Immunity in Plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens[J]. *Science*, 2009, **324**(5 928): 742–743.
- [47] POSTEL S, KEMMERLING B. Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns[C]//Seminars in Cell & Developmental Biology. Academic Press, 2009, **20**(9): 1 025–1 031.
- [48] WANG Z. Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**(1): 7–8.
- [49] ZIPFEL C, KUNZE G, CHINCHILLA D, *et al.* Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts agrobacterium-mediated transformation[J]. *Cell*, 2006, **125**(4): 749–760.
- [50] HEESE A, HANN D R, GIMENEZ-IBANEZ S, *et al.* The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, **104**(29): 12 217–12 222.
- [51] YANG D, HETTENHAUSEN C, BALDWIN I T, *et al.* The multifaceted function of BAK1/SERK3 plant immunity to pathogens and responses to insect herbivores[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**(9): 1 322–1 324.
- [52] XIANG T, ZONG N, ZHANG J, *et al.* BAK1 is not a target of the pseudomonas syringae effector AvrPto[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, **24**(1): 100–107.
- [53] GÖHRE V, SPALLEK T, HÄWEKER H, *et al.* Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB[J]. *Current Biology*, 2008, **18**(23): 1 824–1 832.
- [54] ROBATZEK S, CHINCHILLA D, BOLLER T. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*[J]. *Genes & Development*, 2006, **20**(5): 537–542.
- [55] ALBRECHT C, BOUTROT F, SEGONZAC C, *et al.* Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**(1): 303–308.
- [56] DING Z, WANG H, LIANG X, *et al.* Phosphoprotein and phosphopeptide interactions with the FHA domain from *Arabidopsis* kinase-associated protein phosphatase[J]. *Biochemistry*, 2007, **46**(10): 2 684–2 696.
- [57] POSTEL S, KÜFNER I, BEUTER C, *et al.* The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in *Arabidopsis* development and immunity[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2010, **89**(2): 169–174.