

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CLÁUDIA DE SOUZA LIMA PONTES

COMUNICAÇÃO CRUZADA ENTRE O RECEPTOR ANTIVIRAL NIK1 E
IMUNIDADE ANTIBACTERIANA EM PLANTAS

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

CLAUDIA DE SOUZA LIMA PONTES

**COMUNICAÇÃO CRUZADA ENTRE O RECEPTOR ANTIVIRAL NIK1 E
IMUNIDADE ANTIBACTERIANA EM PLANTAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P814c Pontes, Cláudia de Souza Lima, 1989-
2017 Comunicação cruzada entre o receptor antiviral NIK1 e
imunidade antibacteriana em plantas / Cláudia de Souza Lima
Pontes. – Viçosa, MG, 2017.
viii, 39f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Dissertação
(mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Referências
bibliográficas: f.36-39.

1. Agentes antivirais. 2. Fosforilação. 3. Imunidade.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica
Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 572.59

CLAUDIA DE SOUZA LIMA PONTES

**COMUNICAÇÃO CRUZADA ENTRE O RECEPTOR ANTIVIRAL NIK1 E
IMUNIDADE ANTIBACTERIANA EM PLANTAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de junho de 2017



Paola de Avelar Carpinetti Oliveira



Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)



Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

Aos meus pais Edson e Maria Rita,
minhas irmãs Thaís e Luísa,
ao meu amor Fábio
e minhas sobrinhas Beatriz e Camila.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir viver essa oportunidade de aprendizado e por me manter perseverante e grata por cada conquista.

Aos meus pais Edson e Maria Rita, por serem meus grandes exemplos de vida, por todo o incentivo e confiança depositados em mim em todas as etapas da minha vida e formação.

Ao meu amor Fábio por me incentivar a querer ser sempre melhor, por me ensinar a não desanimar frente às dificuldades, por ser companheiro, ombro amigo e atencioso.

Às minhas irmãs Thaís e Luísa, por estarem sempre por perto, pelo incentivo e momentos de descontração juntas. Por serem ponto de apoio a qualquer hora.

À Beatriz e Camila, minhas sobrinhas, por me fazerem retornar a momentos da inocência e diversão infantil, por acreditar em algo melhor e por recarregarem minhas energias.

À Universidade Federal de Viçosa por me proporcionar tantos anos de aprendizado com excelência, desde o ensino médio, passando pela graduação e pós-graduação e por hoje poder ser parte do seu corpo técnico-administrativo, podendo retribuir todos os anos de ensino.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa.

À Professora Elizabeth Fontes, por ser exemplo de profissional em ensino e pesquisa. Por ter me recebido e pela grande oportunidade de aprendizado e crescimento em seu laboratório no desenvolvimento de uma pesquisa.

Ao meu chefe e coorientador Professor Humberto Ramos, pela sempre disponibilidade em ajudar, pela compreensão e por todo o aprendizado.

À Paola, pelo exemplo de dedicação, de inteligência e de senso de justiça. Pelos momentos de ensinamento, persistência nos experimentos. Por ser amiga, companheira nos períodos noturnos, fins de semana e feriados.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV (NMM-UFV), pela estrutura e disponibilidade para o uso dos equipamentos de microscopia.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas da UFV (NBM-UFV), por oferecer um ótimo ambiente de trabalho e por oferecer estrutura e disponibilidade no uso de equipamentos de espectrometria de massas.

Aos meus colegas de trabalho Edvaldo, Nívea e Pedro pelo bom convívio, incentivo e pela excelente equipe que formam. Por serem profissionais justos e competentes sendo exemplos de dedicação ao que fazem.

Aos demais membros do LBMP e ao Professor Pedro, agradeço a boa convivência, os momentos de conversa e diversão e também de ensinamento. Pelo incentivo mútuo entre todos.

À Gláucia e Marlene por cuidarem do laboratório, ao Adriano pela casa de vegetação.

Agradeço também a todos que não foram citados, mas tem ciência que de alguma forma participaram desse momento.

*“A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)*

RESUMO

PONTES, Cláudia de Souza Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017. **Comunicação cruzada entre o receptor antiviral NIK1 e imunidade antibacteriana em plantas.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Pedro Augusto Braga dos Reis.

NIK1 (*NSP Interacting kinase 1*) é um receptor cinase da família das LRR-RLKs (*leucine rich repeat II – receptor like kinase*), identificado como alvo de virulência da proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*), sendo o principal mediador de uma via de resposta imune contra esse grupo de vírus de DNA. Autofosforilação, de NIK1 em um resíduo de treonina 474 aciona a via de resposta antiviral que culmina com a repressão da expressão de proteínas ribossomais levando à redução da síntese de proteínas da célula vegetal e virais. Apesar de sua atividade antiviral, o transcriptoma de plantas nocautes de *nik1* indicam um possível envolvimento de NIK1 como regulador negativo na resposta imune contra bactérias. Com a finalidade de esclarecer o envolvimento de NIK1 na imunidade inata antibacteriana, foram conduzidos ensaios de fosforilação *in vitro* de NIK1, utilizando os receptores, que intermedeiam PTI (*Pamp-triggered immunity*), BAK1 (*Brassinosteroid insensitive 1- associated kinase*) e FLS2 (*Flagellin sensitive – 2*). Os resultados de espectrometria de massas demonstraram que BAK1 é um possível regulador da fosforilação de NIK1, uma vez que foi capaz de fosforilar um peptídeo sintético em uma treonina correspondente à posição 474 de NIK1 e de modificar a taxa de autofosforilação desse receptor em um ensaio contendo o domínio cinase intacto de NIK1. Além disso, foi demonstrado por BiFC (complementação de fluorescência bimolecular) que NIK1 e NIK1-T474D interagem tanto com BAK1 quanto com FLS2 na membrana plasmática. Ensaios de co-imunoprecipitação (Co-IP) demonstraram que flagelina promove a dissociação de NIK1 dos receptores para formar o complexo imune ativo BAK1-FLS2. Finalmente, ensaios de Co-IP com linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando NIK1 e nocautes de *nik1* indicaram que NIK1 interfere com a formação do complexo BAK1/FLS2 na resposta antibacteriana, já que a superexpressão de NIK1 diminui a eficiência de formação do complexo imune na presença de flagelina, enquanto que a inativação de NIK1 resulta em efeito oposto. Coletivamente, estes resultados substanciam o argumento de que NIK1 atua regulando negativamente PTI em plantas.

ABSTRACT

PONTES, Cláudia de Souza Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Cross-talk between the antiviral receptor NIK1 and plant antibacterial immunity.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos and Pedro Augusto Braga dos Reis.

NIK1 (*NSP Interacting kinase 1*), which was first identified as a virulence target of NSP (*Nuclear Shuttle Protein*), is a receptor-like kinase belonging to the LRR-RLKs (*leucine rich repeat II – receptor like kinase*) family and the major mediator of an immune response against this group of DNA virus. NIK1 autophosphorylation at Thr 474 triggers an antiviral response which culminates with the repression of ribosomal protein gene expression leading to suppression of host and viral protein synthesis. Despite its antiviral activity, the transcriptome of *nik1* knockouts implicates NIK1 as a possible negative regulator of the immune response against bacteria. To examine the NIK1 involvement in antibacterial innate immunity, *in vitro* phosphorylation assays were carried out on NIK1, using the PTI (*Pamp-triggered immunity*)-mediated receptors, BAK1 (*Brassinosteroid insensitive 1- associated kinase*) and FLS2 (*Flagellin sensitive – 2*). The results from mass spectrometry demonstrated that BAK1 may be a regulator of NIK1 phosphorylation, as it was capable of phosphorylating a Thr residue of a synthetic peptide corresponding to the position 474 of NIK1 and modifying the autophosphorylation rate of the NIK1 Kinase domain. Furthermore, BiFC (bimolecular fluorescence complementation) assays demonstrated that NIK1 and NIK1-T474D interact with BAK1 and FLS2 in the plasma membrane. Co-immunoprecipitation (Co-IP) assays showed that flagellin promoted the NIK1 dissociation from BAK1 and FLS2 to form an active BAK1-FLS2 immune complex. Finally, Co-IPs using NIK1-overexpressing transgenic lines and *nik1* knockouts indicated that NIK1 interferes with BAK1-FLS2 complex formation in the antibacterial response, as NIK1 overexpression decreased the efficiency of the immune complex formation in the presence of flagellin, whereas NIK1 inactivation resulted in opposing effects. Collectively, these results substantiate the argument that NIK1 regulates negatively plant PTI.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
Clonagem dos genes	9
Preparo de células competentes e expressão heteróloga	9
Purificação de proteínas fusionadas a GST e expressas em E. coli.	10
Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> e análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF	10
Espectrometria de Massas do Tipo Ion Trap	11
Ensaio de BiFC	13
Transformação de Arabidopsis por mergulha do pendão floral.....	14
Obtenção de protoplastos.....	14
Ensaio de co-imunoprecipitação (Co-IP) em protoplastos de Arabidopsis	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
Um peptídeo sintético, correspondente à sequência de aminoácidos da alça de ativação de NIK1, serve como substrato para NIK1	18
BAK1 atua regulando a autofosforilação de NIK1 <i>in vitro</i>	25
NIK1 e NIK1-T474D interagem com BAK1 e FLS2 e regula a formação do complexo	28
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente em contato com diversas condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento, sendo afetadas diretamente por estresses abióticos (salinidade, luz, temperaturas) ou bióticos (patógenos). Esse último é responsável pela maior perda da produção de grandes culturas voltadas para o agronegócio e produção de alimentos.

Dessa forma, as plantas apresentam mecanismos diferenciados de defesa para detectarem rapidamente a presença do patógeno e desencadear o tipo de resposta adequado. Como primeira barreira contra patógenos, a planta apresenta em sua epiderme uma cobertura denominada cutícula, que é um composto ceroso, capaz de auxiliar a célula vegetal a reduzir a perda de água, além de dificultar a colonização de patógenos na superfície da folha. Ainda nesse sentido, a parede celular também se destaca como barreira física, onde a célula busca se defender do ataque através de pequenas modificações na membrana, aumento de síntese de compostos que a enrijece, buscando isolar a região afetada (Stangarlin *et al*, 2010).

Quando o patógeno consegue burlar esse primeiro sistema de proteção, as plantas apresentam uma segunda barreira de defesa que consiste em duas linhas. Na primeira linha, os receptores de reconhecimento de padrões (PRR – *pattern recognition receptors*) localizados na membrana conseguem identificar padrões moleculares associados a micróbios/patógenos ou algum tipo de dano (MAMPs/PAMPs – *microbe/pathogen-associated molecular patterns* e DAMPs – *damage-associated molecular patterns*, respectivamente). No caso dos MAMPs, o reconhecimento ocorre pela própria presença do micróbio no ambiente celular, como o reconhecimento da flagelina bacteriana (flg), da quitina de fungo, o fator de alongamento que se associa ao ribossomo na fase de alongamento de bactérias Tu (EF-Tu), assim como outras estruturas como peptídeoglicanos (PGN), lipopolissacarídeos (LPS) e β -glucanas de oomicetos. Já no caso dos DAMPs, esses podem ser consequências da presença dos MAMPs, pois os patógenos, ao infectarem ou infestarem seu alvo, liberam algumas substâncias tóxicas como enzimas líticas na digestão de barreiras físicas, como a digestão da parede celular liberando oligogalacturonídeos (OGA), monômeros de cutina de fungos e alguns peptídeos resultantes de proteases microbianas (Boller & Felix,

2009). Esse tipo de imunidade inata é denominado imunidade desencadeada por padrões associados ao patógeno (PTI) e apresenta respostas características como fechamento de estômatos, aumento do influxo de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), reprogramação da transcrição e deposição de calose. (Albert *et al.*, 2015, Bigeard *et al.*, 2015).

Na segunda linha de defesa, a resposta ocorre via intracelular a partir de reconhecimento de efetores específicos de patógenos, daí sua classificação como imunidade desencadeada por efetores (ETI). Esse tipo de resposta ocorre devido à presença de receptores intracelulares que apresentam um domínio de ligação a nucleotídeos e de repetições ricas em leucina (NLR), designados proteínas de resistência (R), responsáveis pela identificação de proteínas efetoras dos patógenos. Assim como PTI, a ETI também apresenta como características da sua resposta o influxo de cálcio, reprogramação da transcrição, aumento da produção de ROS; porém, a resposta da ETI tem como diferencial a resposta imune aguda, que acaba por levar à morte celular (Zhang *et al.*, 2017).

Em todos os tipos de resposta, os receptores são responsáveis por desencadear e ativar ou desativar a cascata de sinalização celular que vai culminar nos efeitos característicos do tipo de resposta imune. Dentre os receptores que se destacam, estão as proteínas cinases que iniciam o processo de ativação das vias através da fosforilação. Na PTI, esses receptores são denominados RLKs (*receptor-like kinases*) e RLPs (*receptor-like proteins*). Em sua maioria eles estão localizados na membrana celular e são distribuídos em mais de 50 diferentes subfamílias, de acordo com sua organização estrutural (Shiu *et al.*, 2004). Um receptor RLK foi identificado como alvo da proteína NSP (*Nuclear Shuttle proteína*) de begomovirus e, assim designado, NIK1 (*NSP-Interacting kinase1*) (Mariano *et al.*, 2004; Fontes *et al.*, 2004). NIK1 é estruturalmente caracterizada como pertencente à subfamília II das 15 subfamílias existentes das proteínas RLKs que contém repetições ricas em leucina (LRR-RLKII) apresentando cinco regiões LRRs. De acordo com essas características e filogenia, essa subfamília foi organizada em três grupos, NIKs, SERKs e LRRIIc (Sakamoto *et al.*, 2012). O primeiro grupo, NIKs, engloba cinco membros incluindo as proteínas NIK1, NIK2 e NIK3 que atuam principalmente na resposta a begomovírus (Sakamoto *et al.*, 2012). O segundo grupo SERKs agrupa as proteínas SERK1-5, envolvidas em desenvolvimento e na resposta imune inata, sendo que SEK3, também designada BAK1, é o membro mais

bem caracterizado envolvido na resposta imune antibacteriana e anti-fúngica (Chinchilla *et al*, 2007), resposta ao desenvolvimento da planta por brassinósteroides (Nam *et al*, 2002) e no processo de morte celular (Halter *et al*, 2014). Por fim, o terceiro grupo LRRIIc agrupa genes de função desconhecida, mas também expressos nos mesmos tecidos e apresentando homologia entre os genes de tomate e *Arabidopsis* (Sakamoto *et al.*, 2012).

Experimentos de busca de parceiros, usando o método do duplo-híbrido e a proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) do vírus TGMV (*Tomato golden mosaic vírus*) como isca, isolaram a proteína NIK1 (Mariano *et al.*, 2004). A proteína viral NSP auxilia a translocação do DNA viral, recém-sintetizado no núcleo de células infectadas, do núcleo para o citoplasma e em conjunto com a proteína viral MP (*Movement protein*) move o DNA viral para as células adjacentes por meio do plasmodesmata (Rojas *et al.*, 2005).

A descoberta de NIK1 ocorreu em tomateiros, quando foi denominada LeNIK (*Lycopersicon esculentum NSP Interacting Kinase*). Assim como em tomateiros, homólogos de LeNIK1 foram analisados em soja e *Arabidopsis*, exibindo alta similaridade de sequência (88% e 76%, respectivamente). Assim, ao se ligar diretamente ao domínio cinase de NIK1, NSP suprime a resposta de defesa da planta, aumentando a patogenicidade do vírus no hospedeiro (Mariano *et al*, 2004).

Em *Arabidopsis*, três proteínas com alta similaridade com NIK1 de soja e de tomateiro foram capazes de interagir com NSP, e foram designadas NIK1, NIK2 E NIK3 (Fontes *et al.*, 2004). Microscopia confocal de raízes de *Arabidopsis* transformadas com NIK1, NIK2 e NIK3, fusionadas à proteína fluorescente verde (GFP – *green fluorescent protein*), detectaram as três proteínas na membrana plasmática (Fontes *et al*, 2004). As linhagens nocautes *nik1*, *nik2* e *nik3* apresentaram maior susceptibilidade a begomovírus, indicando o envolvimento das proteínas correspondentes na imunidade antiviral. Resultados genéticos indicam que, entre eles, NIK1 é o principal gene envolvido na defesa contra begomoviruses em plantas (Fontes *et al.*, 2004).

A região C-terminal de NIK1 apresenta 11 regiões características de proteínas cinase, do tipo serina/treonina. A atividade cinase de NIK1 foi demonstrada por meio de ensaio de fosforilação *in vitro* utilizando o domínio cinase com o sítio ativo intacto de NIK1 (Fontes *et al.*, 2004, Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). Além de atividade

de cinase, foi demonstrado que NIK1 é capaz de se autofosforilar. Na presença da proteína viral NSP, foi observado que a atividade de fosforilação de NIK1 é inibida. A inibição de NIK1 por NSP é específica, uma vez que NSP não se liga a outras proteínas da mesma família (Fontes *et al*, 2004).

O processo de sinalização mediado por NIK1 se inicia através da transfosforilação dos receptores após sua dimerização. A alça de ativação da proteína contém resíduos de treonina cruciais para essa ativação. De fato, mutações dirigidas *in situ* e espectrometria de massa identificaram focos de fosforilação nos resíduos de treonina 474 e 469. Ensaios de complementação de *nik1* nocautes com as proteínas mutantes demonstraram que a fosforilação no resíduo 474 é o determinante principal para a ativação da resposta antiviral, enquanto que fosforilação no resíduo 469 exerce uma função antagonica, inibindo a propagação do sinal antiviral na via de defesa (Santos *et al*, 2009). Embora os sinais moleculares que promovem a ativação de NIK1 são desconhecidas, foi demonstrado que a infecção viral é o elicitor da via de resposta antiviral mediada por NIK1 (Zorzatto *et al.*, 2015).

Subsequentes progressos na elucidação da via antiviral mediada por NIK1 incluiu a identificação dos componentes *downstream*: a proteína ribossomal L10 (RPL10) pela sua capacidade de interagir com NIK1 em leveduras e a proteína nuclear LIMYB (*L10-interacting Myb domain-containing protein*), assim denominada por interagir com RPL10 (Rocha *et al.*, 2008). RPL10 é uma proteína citoplasmática que após ser fosforilada por NIK1 é translocada para o núcleo (Carvalho *et al*, 2008). No núcleo, a proteína L10 interage diretamente com um fator de transcrição LIMYB de modo a reprimir a expressão de proteínas ribossomais (RP) o que leva à diminuição global de síntese de proteínas no hospedeiro, comprometendo a infecção viral (Zorzatto *et al*, 2015).

Em contraposição à ativação dessa cascata de sinalização antiviral, em células infectadas, a proteína viral NSP interage com o receptor imune NIK1, impedindo o processo de fosforilação desencadeado por esse receptor. Dessa forma, a proteína ribossomal não é fosforilada, permanecendo no citoplasma e inibindo a via de defesa. Não tendo a repressão global de tradução, o vírus se prolifera rapidamente (Nicaise, 2015).

O desenvolvimento de mutantes em treonina 474, sendo substituída por alanina e por ácido aspártico (T474A e T474D, respectivamente) permitiu esclarecer a

importância da função desse resíduo para o processo de sinalização. No primeiro caso, a mutação reduziu fortemente a capacidade de NIK1 de se autofosforilar, enquanto o T474D, que mimetiza uma carga negativa constante no resíduo de treonina não inviabilizou a autofosforilação, mas afetou a formação do complexo NSP-NIK1 (Santos *et al.*, 2009). Comparativamente a plantas expressando constitutivamente NIK1, o mutante T474D apresenta maior resistência ao vírus, pois sua ativação constitutiva tem como consequência a redução dos níveis globais de tradução da célula, previamente à infecção viral (Zorzatto *et al.*, 2015; Brustolini *et al.*, 2015).

Embora NIK1 seja o principal receptor LRR-RLK da subfamília II envolvido em sinalização antiviral, outros membros dessa subfamília têm sido descritos como co-receptores de vias de sinalização de desenvolvimento e da imunidade inata em plantas (Ma *et al.*, 2016). Dentre os membros mais conhecidos da subfamília II, destacam-se as proteínas SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinases*) conhecidas por estarem envolvidas em regulação de resposta imune (Chinchilla *et al.*, 2009). A proteína mais bem caracterizada dessa família é SERK3, também conhecida como BAK1 (*Brassinosteroid insensitive 1- associated kinase*). BAK1 foi primeiramente identificado e caracterizado através de ensaio de duplo-híbrido como a principal proteína que interagia com BRI1 (*Brassinosteroid insensitive 1*; Nam & Li, 2002). Ensaios de coimunoprecipitação identificaram que BRI1 se ligava a BAK1, podendo formar um complexo heterodimérico na superfície celular. O hormônio brassinolídeo liga-se ao receptor BRI1 e provoca a formação de um complexo ativo com o co-receptor BAK1, induzindo eventos de transfosforilação e ativação da cascata de sinalização. BRI1 se apresenta na membrana de forma homodimérica na ausência do hormônio brassinolídeo, não sendo capaz de ativar sozinha a cascata de sinalização de desenvolvimento da planta. (Wang *et al.*, 2008)

Posteriormente, BAK1 foi descrita como protagonista de outra via de sinalização, a via de resposta a PTI onde atua como co-receptor de outro RLK, denominado FLS2 (*Flagellin-sensitive 2*) (Sun *et al.*, 2013). O processo de resposta imune é desencadeado pela percepção do peptídeo bacteriano flg22 na porção extracelular de FLS2 que se ligam e recrutam BAK1 (Figura 1). A flagelina bacteriana forma ligações com ambos os receptores e essa proximidade leva ao evento de transfosforilação e heterodimerização do complexo, responsáveis pela ativação da via de resposta. Além disso, BAK1 funciona como co-receptor de diversos outros PRRs,

incluindo EFR (ELONGATION FACTOR-thermo unstable, EF-Tu, receptor) e PEPR1 (PEP1 receptor), que percebem específicos PAMPs/DAMPs e ativam ou amplificam PTI (Ma *et al.*, 2016).

A regulação da interação de BAK1 com outras proteínas foi observada em estudos recentes, que encontraram outra proteína envolvida na regulação do processo, denominada BIK1 (*Botrytis-induced kinase 1*) que regula positivamente o evento de resposta imune e simultaneamente regula negativamente a sinalização da via a BR. Essa sinalização ocorre devido à fosforilação de diferentes resíduos durante sua interação (Lin *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017).

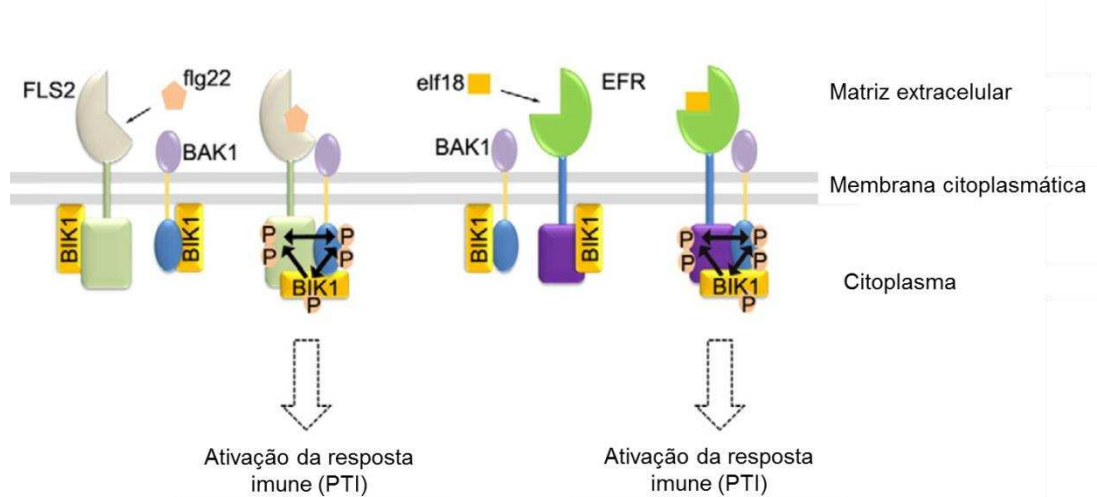


Figura 1 - Ativação da resposta imune desencadeada por patógenos (PTI). Adaptado de Wang *et al.*, 2014. No primeiro complexo, FLS2 e BAK1 se apresentam separadamente como proteínas de membrana associadas à proteína BIK1. Somente na percepção do peptídeo bacteriano flagelina (flg22) pelo receptor FLS2, há a formação do heterocomplexo FLS2/BAK1, onde há a transfosforilação dos receptores mediado por BIK1 que culmina na ativação da resposta imune. Da mesma forma, a percepção do peptídeo elf18 pelo receptor EFR, recruta BAK1 e um processo semelhante de transfosforilação entre os receptores juntamente com BIK1, culmina na ativação da resposta imune.

Embora exista similaridade estrutural entre os receptores NIK1 e BAK1, o mecanismo pelo qual NIK1 intermedeia um mecanismo de resposta antiviral é totalmente diferente da resposta imune inata, PTI, mediada por BAK1 (Figuras 1 e 2). No mecanismo de ativação de PTI, o co-receptor BAK1 forma um complexo ativo com PRRs mediante a ligação do receptor com PAMPs, apresentados pelos patógenos (Figura 1, Wang *et al.*, 2014). Ativação de PTI resulta na rápida produção de ROS, ativação de MAPKs, indução de genes de defesa e deposição de calose, como resposta de defesa do hospedeiro. Por outro lado, no mecanismo de imunidade antiviral mediada por NIK1, a ativação de NIK1 intermedeia a translocação de RPL10 para o núcleo, onde

interage com LIMYB para reprimir a expressão de genes da maquinaria de tradução, resultando em inibição de tradução dos mRNAs virais e do hospedeiro, aumentando assim a tolerância a begomovírus (Figura 2; Calil e Fontes, 2017; Gouveia *et al.*, 2017).

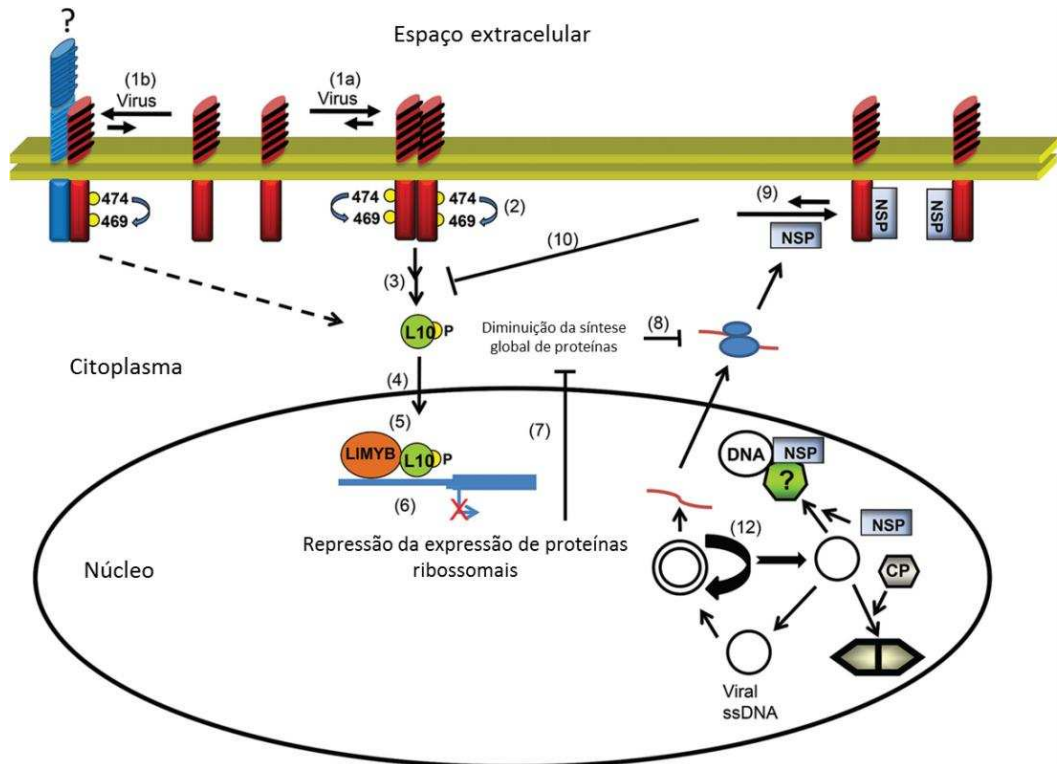


Figura 2 – **Via de sinalização da resposta antiviral mediada por NIK1.** A infecção pelo vírus induz a formação da homodimerização do domínio extracelular de NIK1 (1a), de forma que a aproximação do domínio cinase permite que ocorra a transfosforilação no resíduo T474 de ambos, ativando-os (2). NIK1 também pode interagir com outro ligante LRR-RLK desconhecido na presença de estímulo viral (1b). Embora a infecção viral tenha como alvo a via de sinalização antiviral mediada por NIK1, as bases moleculares desse processo permanecem desconhecidas. Após a ativação, NIK1 participa indiretamente da fosforilação da proteína RPL10 (3) promovendo sua translocação para o núcleo da célula(4). No núcleo, ela vai interagir diretamente com LIMYB (5) de forma a reprimir a expressão de proteínas ribossomais (6). Como consequência, ocorre a supressão da tradução global de proteínas (7), de forma impedir a tradução do mRNA viral (8) . A proteína NSP de begomovírus se liga especificamente na alça de ativação de NIK1, inibindo sua autofosforilação em T474 (9), de forma que a proteína RPL10 não fosforilada se mantenha no citoplasma de células infectadas (10), favorecendo o processo de infecção viral. O DNA de fita única do vírus se replica através de intermediários do processo de replicação celular do DNA de fita dupla da célula infectada (12). NSP é capaz de se ligar ao DNA viral nascente que facilita o processo de movimento dessa proteína para o citoplasma mediado por alguma exportina ainda não identificada. (Adaptada de Machado *et al.*, 2015).

Consequentemente, a resposta de imunidade antiviral mediada por NIK1 culmina na supressão da tradução global, o que representa um novo paradigma para

defesas antivirais em plantas. Interessantemente, a análise do transcriptoma de mutantes *nik1* sugerem que NIK1 pode suprimir as respostas imunes antibacterianas, indicando um possível efeito oposto de NIK1 em infecções por bactérias e por vírus. Foi observado que o silenciamento de NIK1 regula a expressão de genes que estão envolvidos na via de sinalização do ácido salicílico, hormônio envolvido na resposta imune de plantas e genes envolvidos na resposta à bactéria (Machado *et al*, 2015).

O principal objetivo dessa investigação consistiu em elucidar a possível comunicação cruzada entre NIK1, caracterizado como componente de defesa antiviral, com vias de imunidade antibacteriana em plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Clonagem dos genes

O clone pUFV732, contendo o domínio cinase de NIK1 fusionado a GST, foi previamente descrito (Fontes *et al.*, 2004). O clone pUFV2514 contendo o fragmento de DNA, que codifica o domínio cinase de BAK1 (KDBAK1), fusionado a GST foi gentilmente cedido pelo Dr Ping He. O fragmento correspondente ao domínio cinase de FLS2 (KDFLS2) foi amplificado de pUFV2474 (pHBT-FLS2-FLAG), gentilmente cedido por Dr Ping He, clonado, por recombinação, em pDONR221, produzindo o clone pUFV2984. Em seguida, KDFLS2 foi transferido, por recombinação, para o vetor de expressão pGEX-4T-1. O clone resultante pUFV2654 permite a síntese heteróloga de KDFLS2 contendo uma cauda GST (Glutathione S-Transferase) fusionada à região N-terminal da proteína. Os primers utilizados nas clonagens dos domínios cinases dos receptores são descritos na Tabela 1.

As colônias individuais de *E.coli* transformadas com as construções descritas acima, foram incubadas em 5 mL de meio LB contendo o antibiótico de seleção do vetor ampicilina 100mg/L, a 37°C por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído através do *kit Miniprep Extraction kit* (Qiagen). Uma alíquota de cada vetor contendo os genes das cinases foi utilizada para transformação de *E. coli* da estirpe BL21:DE3 (pLYSs), utilizada nos ensaios de expressão.

Preparo de células competentes e expressão heteróloga

As células da *E.coli* da estirpe BL21:DE3(pLYSs) foram cultivadas em 5mL de LB contendo o antibiótico de seleção cloranfenicol (35 mg/mL). A cultura foi centrifugada a 6000 g por 2 minutos e o pellet foi ressuscitado em 1000 µL de CaCl₂ 0,1M. Esta solução foi novamente centrifugada e o pellet ressuscitado em 150 µL do CaCl₂ 0,1 M (Sambrook *et al.*, 1989). As alíquotas de 75 µL foram transformadas com cada plasmídeo, pelo método de choque térmico, e a cultura crescida foi plaqueada em meio LB sólido contendo os antibióticos de seleção, ampicilina (100 mg/L) e cloranfenicol (35 mg/mL). Os transformantes foram confirmados por PCR e o produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% (p/v).

Os transformantes selecionados foram pré-inoculados em 5 mL meio LB acrescido dos antibióticos de seleção por 16 horas. Em seguida foram diluídos em 500 mL de meio LB contendo os mesmos antibióticos e a cultura foi incubada a 37°C, 150 rpm até atingir $OD_{600nm} = 0,8$. Em seguida, foi adicionado isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,4 mM e a cultura foi incubada a 20°C, 120 rpm por 16 horas. A cultura foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos a 4°C e o pellet congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até uso.

Purificação de proteínas fusionadas a GST e expressas em *E. coli*.

As células sedimentadas de *E. coli*, expressando as proteínas de interesse, foram ressuspendidas em PBS 1X ((NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, pH7,3) com adição de inibidores de protease, PMSF 30 μ M, Benzamidina 15 μ M e Thiourea 15 μ M. Nesta solução, foram também adicionados 100 μ g.mL⁻¹ de lisozima, mantendo-se por 30 minutos no gelo. A lise celular foi obtida por ultrassonicação com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 x g por 30 minutos para a remoção de restos celulares e obtenção do sobrenadante.

Ao sobrenadante, foi adicionado a resina Glutathione Sepharose 4B (GE HealthCare), previamente equilibrada com o tampão PBS 1X. Após 4 horas sob agitação lenta, as proteínas aderidas à resina foram eluídas com o tampão de eluição contendo glutathione reduzida (L-glutathione reduzida (Sigma), Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Uma alíquota do eluato foi analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (m/v) e quantificado pelo método de Bradford (1976) para verificar a eficiência da expressão e purificação.

Ensaio de fosforilação *in vitro* e análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF

Para verificar a atividade cinase das proteínas de estudo, após a purificação foi realizado um ensaio de fosforilação com um peptídeo sintético denominado P2

(GTVGHIAPEYLSTGQSSEK). Para isso, 10 µg de proteína purificada e 50 µM do peptídeo foram incubados em Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM e ATP 100 µM por 1 hora à temperatura ambiente.

Para análise da fosforilação do peptídeo sintético, a análise foi realizada, primeiramente por espectrometria de massas do tipo MALDI - Matrix-assisted laser desorption/ionization. Para essa análise, a matriz utilizada foi o ácido 2,5 dihidroxibenzóico – DHB (Bruker Daltonics, Alemanha), solubilizada na solução de acetonitrila 50% (v/v), acidificada com ácido trifluoracético 0,1% (v/v), para uma concentração final de 10 mg/mL. Antes da aplicação da amostra, foi necessária a calibração do equipamento e utilizando o método de análise MS1 com peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha). Em seguida, 1 µL de cada amostra e 1 µL de matriz foram aplicados e homogeneizados em cada *spot* de placa de aço apropriada para análise. Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics).

Para obtenção dos dados de MS1, utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Os dados de MS2 foram obtidos, usando o método LIFT no modo positivo, para o qual foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z). Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo flexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha).

Foi também utilizado o espectrômetro IonTrap (Amazon Bruker Daltonics) acoplado a nanoUPLC (Waters) como forma de confirmar a sequência, quantificar e monitorar a fosforilação do peptídeo em baixa intensidade.

Espectrometria de Massas do Tipo Ion Trap

Os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 80 µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v), centrifugados a 20.000 x g por 20 min, sendo 75 µL dessa solução transferidos para vials de 500 µL. Uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi aplicada em um sistema LC-MS/MS, composto por um UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo Ion Trap ETD Amazon (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram submetidas a uma corrida cromatográfica em uma

coluna trap e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 μm – 100 μm x 100 mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo online, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. As soluções de fase móvel utilizadas para o programa de gradiente foram água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), com o programa da corrida iniciando de um passo de dessalinização com a manutenção de 5% (v/v) de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 15 minutos. Em seguida, um gradiente linear de 5% a 50% (v/v) da solução acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 30 min, 50% durante 5 min, seguido por gradiente linear de 50% a 90% durante 3 min, 90% durante 2 min, seguido por gradiente de 90% a 10% durante 3 min, e mantidos a 10% durante 3 min. O escaneamento em modo positivo dos íons para os espectros de MS1 foi efetuado para a faixa de massas entre 300 e 1500 m/z, sendo para os espectros de MS2 entre 70 e 3000 m/z. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 60 minutos.

Para identificação dos sítios de fosforilação, foi utilizado o método para aquisição automática dos espectros de MS1 e MS2 no modo auto-MSn. Para fragmentação dos peptídeos, foi utilizado o método *neutral loss* pseudo MS3, onde foi aplicado uma excitação por CID (Dissociação induzida por colisão) para liberação da perda neutra do íon fosfato, seguida de uma aquisição da fragmentação por ETD (Dissociação induzida por transferência de elétron) (MS2) dos íons que apresentaram perda de 98 Da, 49 Da e 32,7 Da. Para quantificação da abundância relativa dos peptídeos fosforilados identificados pelo método anterior, foi utilizado o método de escaneamento do tipo MRM com duas transições para cada íon monitorado. As áreas dos cromatogramas extraídos dos íons (XIC) para os peptídeos fosforilados e não fosforilados foram utilizadas para as quantificações relativas normalizadas para cada corrida de LC/MS.

A aquisição dos dados foi gerenciada pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas nos formatos mascot generic format (*.mgf) para identificação dos peptídeos e seus respectivos sítios de fosforilação, utilizando o algoritmo MASCOT em servidor local. Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida;

carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina e fosforilação da treonina, serina e tirosina como modificação variável; tolerância de erro de 0,15 Da tanto para o íon parental, quanto para os fragmentos. Para confirmação do sítio de fosforilação foram verificados os íons com perda neutra para os espectros de CID e a presença do fosfato (80 Da) no mesmo resíduo.

Ensaio de BiFC

A ORF de *AtNIK1* foi amplificada de pDON-*AtNIK1* (Fontes *et al.*, 2004) e inserido, por recombinação, em pDONR201, resultando em pUFV1898. O cDNA de *AtBAK1* foi amplificado de pUFV2472 (pHBT-*BAK1*-GFP, gentilmente cedido pelo Dr Ping He) e inserido por recombinação em pDONR207, resultando no clone pUFV3023. O cDNA de *AtFLS2* foi amplificado de pUFV2474 (pHBT-*FLS2*-FLAG, gentilmente cedido pelo Dr Ping He) e inserido em vetor de entrada pDONR207, resultando em pUFV3021. O clone pUFV622, contendo a ORF mutada de *AtNIK1*, *NIK1T474D*, em pDONR201 foi previamente descrito (Santos *et al.*, 2009). Em seguida, as ORFs de *AtNIK1*, *NIK1T474D*, *AtBAK1* e *AtFLS2* foram transferidos, por recombinação, para vetores de expressão SPYNE e SPYCE do sistema Gateway (Invitrogen), contendo parte da proteína fluorescente YFP nas suas porções amino (N) e carboxi-terminal (C), respectivamente. Foram obtidos os clones *NIK1*-SPYNE (pUFV 3025), *NIK1*-SPYCE (pUFV 3026), *BAK1*-SPYNE (pUFV 3029), *BAK1*-SPYCE (pUFV 3030), *FLS2*-SPYCE (pUFV 3031), *FLS2*-SPYNE (pUFV 3032), *NIK1T474D*-SPYNE (pUFV 3027), *NIK1T474D*-SPYCE (pUFV 3028).

Agrobacterium tumefaciens da estirpe GV3101 foi transformada com os clones descritos acima. As culturas crescidas em meio LB a 28°C durante 16 horas foram centrifugadas a 6000 x g por 5 minutos. O pellet foi lavado e ressuspenso em tampão de infiltração (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetoceringona 300 µM) para OD_{600nm} = 0,3 e infiltrados em *Nicotiana benthamiana*. As plantas foram infiltradas e, após dois dias, analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser Zeiss LSM510 META, na faixa de excitação 514 nm, utilizando laser hélio neon e com a emissão a 560 a 615nm.

Transformação de Arabidopsis por mergulha do pendão floral

Para obtenção de linhagens transgênicas de Arabidopsis, a ORF de NIK1 em pDON-NIK1-NS (Fontes *et al.*, 2004) foi transferida, por recombinação tripla, para o vetor de transformação em planta 2x35S::NIK1-6HA-pH7m34gw, resultando no clone pUFV2226. O DNA plasmidial extraído foi utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 por eletroporação (2500 mV, 3-4 ms). O transformante foi plaqueado e selecionado em meio de cultura LB contendo gentamicina (50 mg/L) e espectinomicina (100 mg/L) e confirmados via PCR.

A colônia confirmada foi inoculada em meio LB contendo os antibióticos de seleção gentamicina (20 mg/L) e espectinomicina (100 mg/L) a 28°C até atingir $O.D_{600nm} = 0,6-0,8$. A cultura será centrifugada por 6000 x g por 10 min a 25°C. O *pellet* foi ressuscitado em solução sacarose 5% (m/v) contendo Silwet-L77 0,02% (v/v). Arabidopsis Col-0 foi transformada pelo método do mergulho do pendão floral por três semanas consecutivas (Bent *et al.*, 2006). Três linhagens independentes, NIK1-6HA-1, NIK1-6HA-2, NIK1-6HA-7, foram selecionadas para análises posteriores.

Obtenção de protoplastos

Para o isolamento dos protoplastos, foram utilizadas folhas das linhagens transgênicas de Arabidopsis expressando NIK1-6HA. As sementes transgênicas desinfestadas foram plaqueadas em meio MS ½ força, contendo antibiótico higromicina (10 mg/mL) e cultivadas por 15 dias até serem transplantadas para vasos; então, por mais 15 dias em câmara de crescimento com temperatura controlada a 22°C com fotoperíodo de 10-13 horas. As folhas foram cortadas com lâmina em tiras de 0.5-1 mm, dando preferência para a região central da folha. 10-20 folhas foram digeridas em 5-10 mL de solução enzimática (MES 20 mM, Manitol 0,4 M e KCl 20 mM. celulase 1,5% (w/v) e macerozima 0,4% (w/v) , CaCl₂ 10 mM e BSA 0,1% (m/v). Após o corte, o tecido foi imediatamente mergulhado na solução enzimática, e incubado à vácuo por 30 min no escuro usando dissecador e a digestão procedeu por três horas. A qualidade dos protoplastos foi monitorada em microscópio em câmara de Neubauer e, então,

adicionou-se a solução W5 (MES 2 mM, NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM e KCl 5 mM) em igual proporção à solução enzimática. Pedacos de folhas não digeridas e interferentes foram removidos com um filtro de 75 µm. Os protoplastos foram centrifugados a 200 x g por 2 minutos e ressuspensos com a solução W5 na concentração de 2 x10⁵ protoplastos /mL. O tubo foi deixado em repouso na vertical por 15 minutos para sedimentação dos protoplastos por gravidade e o sobrenadante foi totalmente removido. Os protoplastos foram, então, ressuspensos em MMg (MES 4 mM, manitol 0,4 M e MgCl₂ 15 mM) na concentração 2 x10⁵ protoplasts /mL a temperatura ambiente, transfectados com 10 µg de cada construção de DNA e incubados por 12 horas em solução WI (MES 4 mM pH 5,7, Manitol 0,5 M e KCl 20 mM) (Yoo *et al*, 2007).

Ensaio de co-imunoprecipitação (Co-IP) em protoplastos de Arabidopsis

Os protoplastos de Arabidopsis, transfectados com as construções de DNA de interesse, foram centrifugados e ressuspensos em tampão de lise [HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM e glicerol 10% (v/v)] contendo inibidores de protease e fosfatase e incubados no gelo por 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13000 x g por 10 min a 4°C e ao sobrenadante foi adicionado proteína-G-Agarose pré-equilibrada com o tampão de imunoprecipitação, seguido por incubação a 4°C com leve agitação por uma hora. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13000 x g por 5 min a 4°C e ao sobrenadante foi adicionado o anticorpo desejado e incubada a 4°C, sob leve agitação em shaker orbital durante duas horas. Após o período de incubação, foram adicionadas *beads* de proteína-G-agarose prorrogando a incubação por mais duas horas a 4°C. Na sequência do procedimento, a solução foi centrifugada a 13000 x g, 4°C por um minuto para sedimentar as *beads*. O sobrenadante foi armazenado para análise da eficiência do processo. O pellet foi lavado três vezes com o tampão de lavagem contendo [HEPES 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v) e Triton 0,1% (v/v)] nas mesmas condições de centrifugação, descritas para sedimentar as *beads*. Por fim, as *beads* foram ressuspensas e centrifugadas com Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e o produto foi eluído em tampão SDS-Laemmli 2X e incubado a 95°C por 10 min. As amostras foram resolvidas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (m/v) e analisadas por western blot.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados em reações de PCR

Primer	Sequência (5'-3')
FLS2_FWD	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAAGTTACTCTCA
KDFLS2_FWD	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTCATCAGAGTCCTC
FLS2_NS_RVS	AGAAAGCTGGGTCAACTTCTCGATCCTCGTT
KDBAK1	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGACCCAGAAGTTCA
KD At BAK1 RV	AGAAAGCTGGGTCTTCATTAAAGCATTCTTACAAC
BAK1-FWD	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAACGAAGATTA
ATNIK FG	AAAAAGCAGGCTTCACAATGGAGAGTACTATTGTT
KDNIK1FG	AAA AAG CAG GCT TCA CAA TGG GAG CTG CAA GAG GG
ATNIKRG	AGAAAGCTGGGTCTGAGTCATAAGAGATTTTCGATG
Attb1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
ATTB2	GGGGACCACTTTGTAGAAGAAAGCTGGGT
pDON201	TCGCGTTTAACGCTAGCATGGATC
pDON 201 E 207 RVS	TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
pDEST15GSTFWD_4798	CCAATGTGCCTGGATGCGTTCC
35S_MC36_3408	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
SPYNE	TTAGGCCATGATATAGACGT
SPYCE	TTACTTGTACAGCTCGTCCA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A principal característica entre determinado grupo das PRR classificadas como RLKs é o fato de possuírem um domínio cinase contendo características estruturais típicas como sítio de ligação ao ATP, sítio ativo da proteína e domínio catalítico. Essa região completa é a responsável pelo evento de fosforilação entre os parceiros tendo como consequência a regulação de uma via de sinalização. O entendimento das interações entre as proteínas de membrana dessa família pode fornecer informações sobre a regulação decorrente de condições de adversidade que a célula pode ser submetida. A observação de que inativação de NIK1, em *nik1* nocaute, induz a expressão de genes do sistema imune de plantas levantou a hipótese de que NIK1 pudesse também estar envolvida na imunidade inata de plantas, PTI. Assim sendo, as possíveis interações entre NIK1 e receptores que intermedeiam PTI, como BAK1 e FLS2, foram analisadas, inicialmente, pela capacidade de transfosforilação entre os receptores.

O uso do domínio cinase em ensaios *in vitro* pode esclarecer se há interações de ativação ou inibição da fosforilação específicas entre receptores. Assim, o domínio cinase dos receptores NIK1, BAK1 e FLS2 foram clonados para expressão em *E. coli* e purificação das proteínas recombinantes. A Figura 3 esquematiza as regiões características das proteínas como as regiões ricas em leucina (LRR), o domínio transmembrana (TM) e o domínio cinase. Os domínios cinases delimitados pelos oligonucleotídeos, indicados pelas setas vermelhas, foram expressos em *E. coli*.

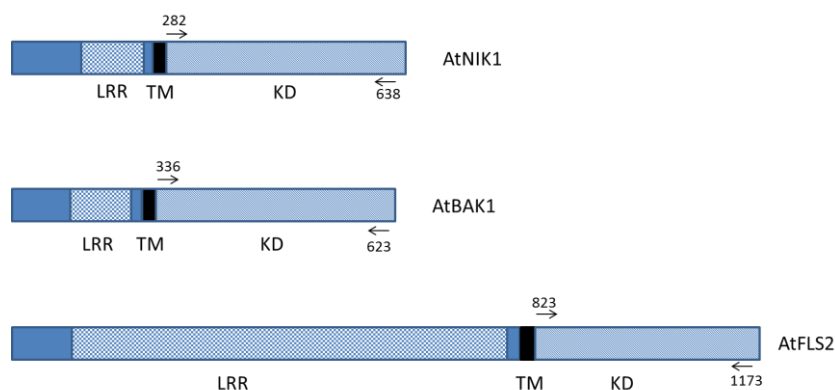


Figura 3 - Região de clonagem dos domínios cinase das proteínas de Arabidopsis NIK1, BAK1 e FLS2. LRR - regiões ricas em leucina, TM - domínio transmembrana e KD - domínio cinase.

As proteínas KDNIK1, KDBAK1 e KDFLS2, fusionadas a cauda de GST e expressas em *E. coli* (BL21), foram purificadas por cromatografia de afinidade e submetidas a gel SDS-PAGE 10% (m/v). Para todas as proteínas foram coletadas três frações de eluições.

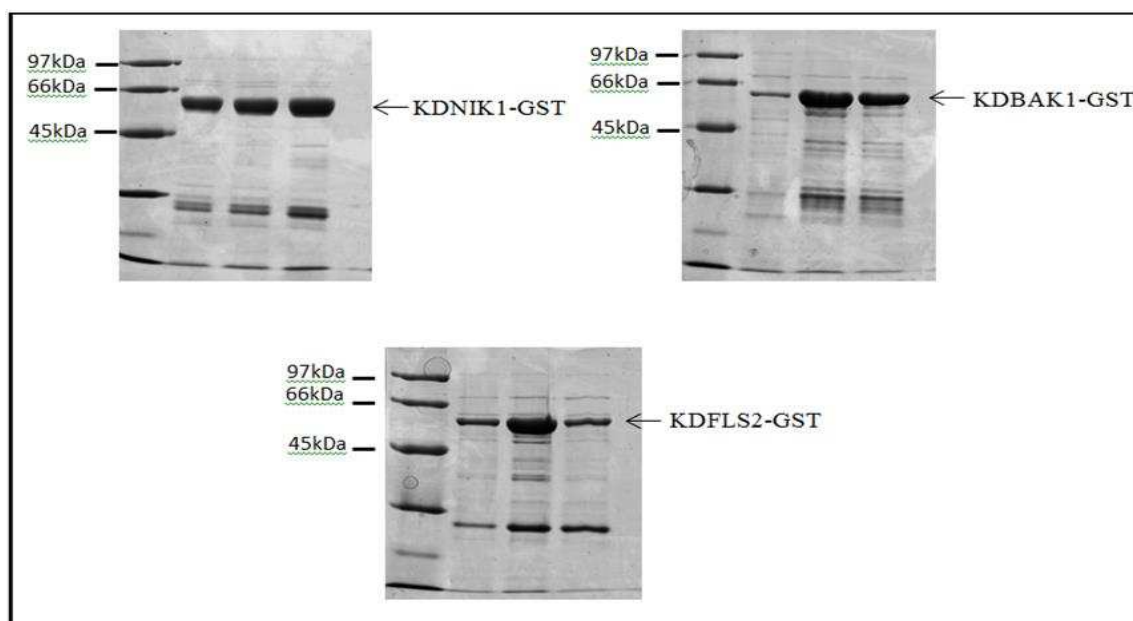


Figura 4 - Purificação das proteínas expressas em bactéria em mesmas condições. As canaletas 1,2 e 3 se referem ao 1º, 2º e 3º eluatos.

Nota-se que, embora seja aplicado o mesmo protocolo e condições de expressão, há uma diferença entre as quantidades de proteínas obtidas em cada eluição, mas ainda assim, todas foram purificadas em homogeneidade relativamente alta. As proteínas apresentam massa molecular KDNIK1 (63kDa), KDBAK1 (63kDa) e KDFLS2 (64kDa) conforme predito pela massa molecular dos domínios de cinase e de GST.

Um peptídeo sintético, correspondente à sequência de aminoácidos da alça de ativação de NIK1, serve como substrato para NIK1.

Tem sido previamente demonstrado que o resíduo de treonina, presente na posição 474 na alça de ativação do domínio cinase de NIK1, é essencial para ativação da cinase que ocorre por autofosforilação (Santos *et al.*, 2009). A fim de confirmar a estabilidade da proteína purificada KDNIK1 truncada, foi avaliada a sua capacidade de fosforilar um peptídeo sintético contendo uma sequência de 22 resíduos de aminoácidos da alça de ativação de NIK1 que sobrepõe a posição da treonina 474, designado peptídeo P2. O peptídeo sintético denominado P2 (GTVGHIAPEYLTGQSSEK), de

massa 1961 Da, contém a sequência de aminoácidos de NIK1 de acordo com sua clivagem com tripsina, simulando o efeito resultante da análise da clivagem e sendo também atuante como um padrão interno para padronização do método de análise no espectrômetro. Esse peptídeo, previamente analisado por espectrometria de massas do tipo *MALDI-TOF/TOF*, foi submetido à ensaio de fosforilação na presença de KDNIK1, KDBAK1, e KDFLS2. No espectrômetro MALDI-TOF/TOF, a amostra é aplicada juntamente com uma matriz – no caso foi utilizado DHB (ácido 2,5-diidroxibenzoico) – que cristaliza sobre uma placa de metal que é inserida no equipamento. Essa matriz auxilia na ionização da amostra, de modo que o peptídeo com carga positiva “voe” no campo magnético até o detector. Em um MALDI-TOF/TOF é mais comum que o peptídeo adquira a carga +1. No intuito de verificar se o peptídeo foi sintetizado corretamente, foi examinado o MS1. Os espectros MS1 e MS2 e os resultados obtidos foram analisados no software flexAnalysis (Bruker Daltonics). O espectro MS1 confirma a resolução do pico 1961 Da com alta abundância (Figura 5). Ao submeter esse peptídeo a uma nova fragmentação, é possível determinar sua sequência através da fragmentação –b e –y. Esse é um tipo de fragmentação que analisa a clivagem na cadeia peptídica, permite a identificação de cada resíduo de aminoácido presente naquela estrutura, sendo definida como sequenciamento de novo. Assim, no espectro MS2 (Figura 5), a fragmentação do pico em 1961 permitiu identificar a sequência do peptídeo indicando que não há nenhuma modificação em sua estrutura, sendo os dois outros picos presentes, adutos de sódio devido ao tampão fosfato presente na amostra.

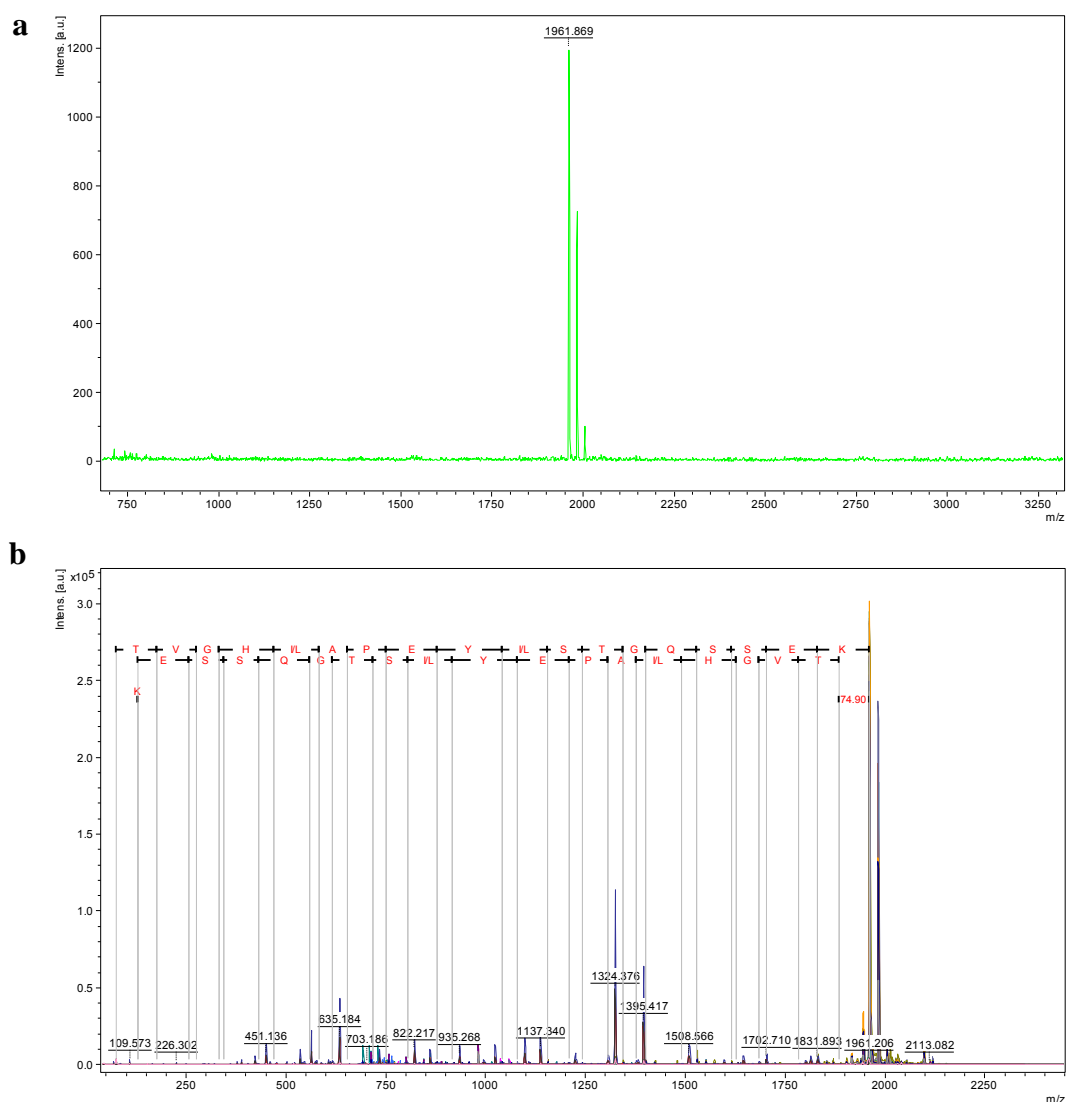


Figura 5 - Análise do pico do peptídeo sintético (1961 kDa) e sua fragmentação. a. O espectro MS1 indica a presença do peptídeo sem modificações. **b.** O espectro MS2 mostra a fragmentação do peptídeo sintético confirmando a sequência sem modificações.

Em seguida, foi analisado se o peptídeo serviria como substrato para NIK1 já que NIK1 é capaz de se autofosforilar na treonina 474, que está contida na sequência do peptídeo P2. Sendo assim, o peptídeo P2 foi submetido ao ensaio de fosforilação *in vitro* utilizando o domínio cinase de NIK1 purificado e ATP (Figura 6). Em um espectro de massas, a presença de um grupo fosfato é detectada quando há uma diferença de massas de 80 kDa. A massa do peptídeo 1961 Da, acrescida de 80 Da da fosforilação, permite a visualização e investigação da fragmentação do pico 2041. O espectro MS1 gerado pelo MALDI-TOF-TOF demonstra a presença de um pico 2041 correspondente ao peptídeo fosforilado (Figura 6).

O sequenciamento do peptídeo fosforilado (espectro MS2, Figura 6) confirma que a fosforilação por NIK1 ocorre na segunda treonina do peptídeo P2, correspondente ao resíduo 474 na proteína intacta. A treonina apresenta de forma isolada a massa correspondente a 101 Da e fosforilação em seu resíduo justifica o incremento de 80 kDa na massa total.

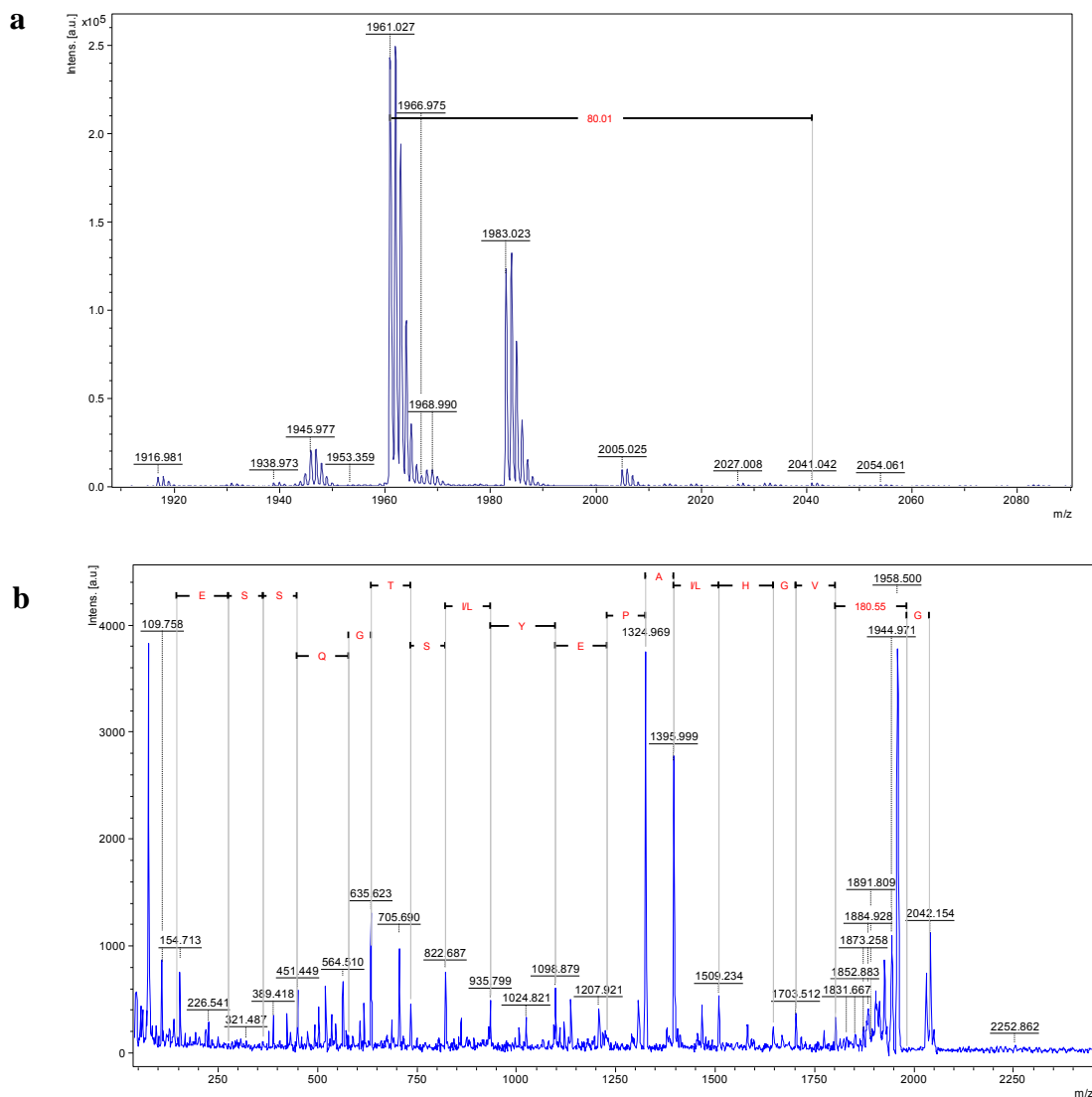


Figura 6 - Análise da fosforilação do peptídeo sintético P2 pelo domínio cinase de NIK1. a. A massa do peptídeo não fosforilado é de 1961 e a massa do peptídeo fosforilado é de 2041. O espectro MS1 mostra a presença do pico 2041, comprovando a fosforilação. b. O espectro MS2 apresenta o sequenciamento do peptídeo sintético e indica que a fosforilação ocorreu no resíduo de treonina 474. A sequência de aminoácidos é GTVGHIAPEYL**ST**GQSSEK. O T em negrito refere-se à treonina na posição 474 da sequência de aminoácidos de NIK1.

BAK1, mas não FLS2, fosforila o peptídeo P2 na treonina, correspondente a posição 474 de NIK1.

Uma vez demonstrado que o peptídeo P2 serve como substrato para NIK1 indicando fosforilação no resíduo de treonina 474 de NIK1, o referido peptídeo foi também utilizado em ensaios de fosforilação a fim de examinar se a cinase NIK1 também seria fosforilada por BAK1 e/ou FLS2 na posição 474, por espectrometria de massa. Análise do espectro MS1, utilizando FLS2 purificado em ensaios de fosforilação, indica que os resíduos da alça de ativação de NIK1 representados pelo peptídeo P2 não são fosforilados por FLS2 *in vitro* (Figura 7). Nenhum pico correspondente à adição de um ou múltiplos fosfatos foi identificado, demonstrando que o peptídeo P2 não serve como substrato para FLS2. Em contraste, o espectro MS1, utilizando BAK1 purificada em ensaios de fosforilação do peptídeo P2, detectou um pico correspondente ao peptídeo fosforilado, mas devido a sensibilidade limitada do equipamento, não foi possível gerar um espectro MS2. Assim, o ensaio de fosforilação de BAK1 com o peptídeo sintético foi analisado em um espectrômetro de massa do tipo Ion Trap (Figura 8).

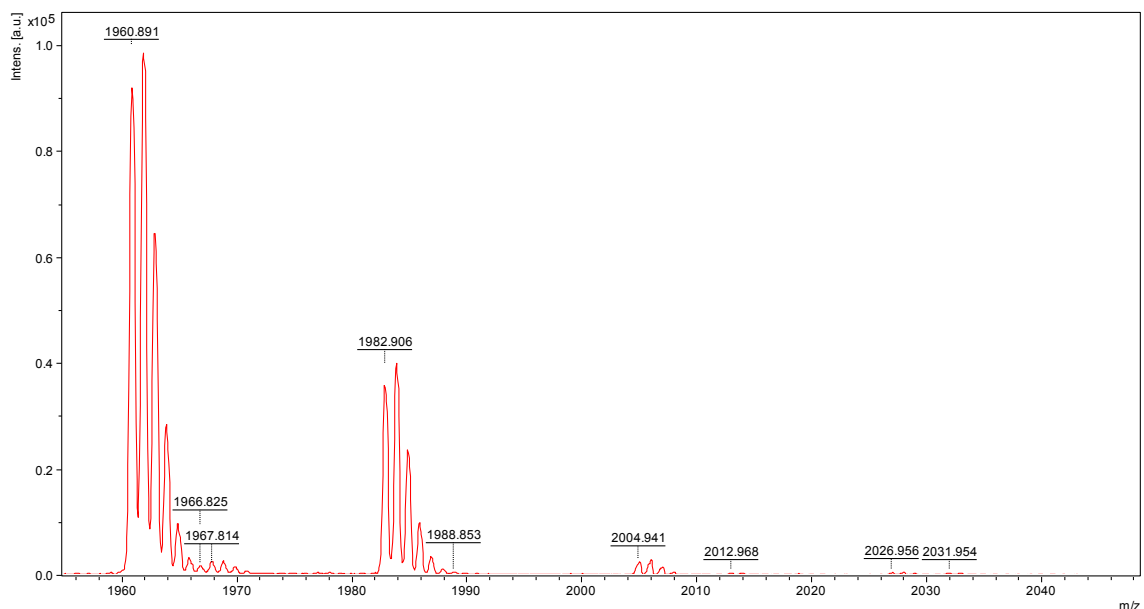
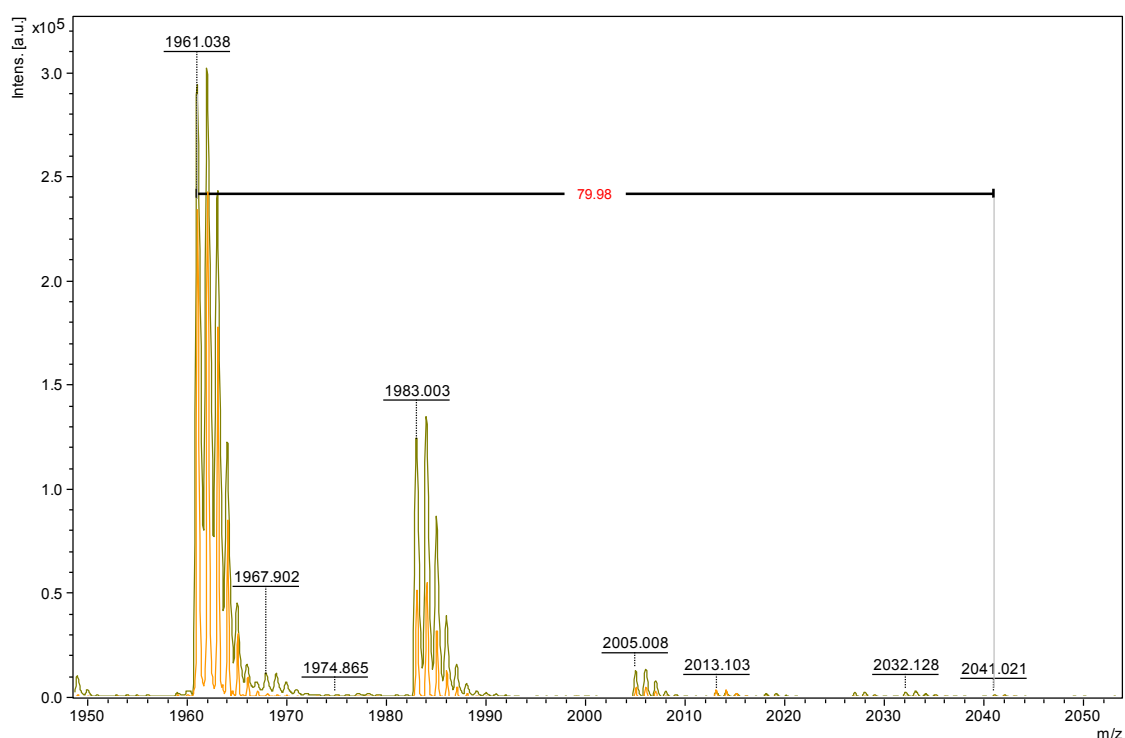
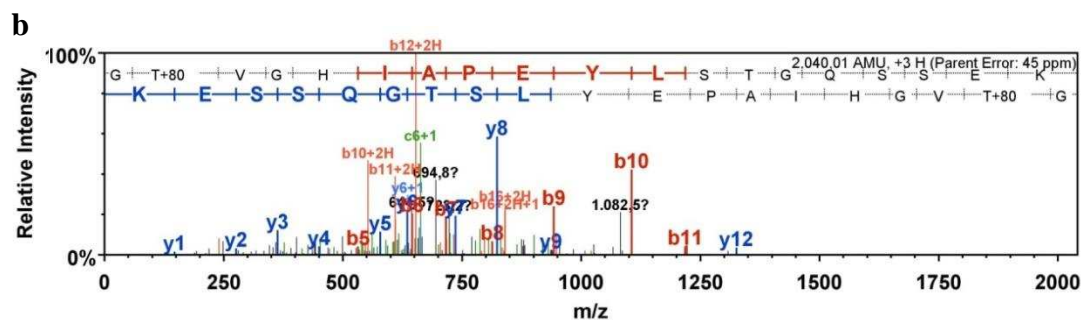


Figura 7 - O espectro MS1 do peptídeo sintético P2 não apresenta pico de fosforilação em 2041. Em ensaio com o domínio cinase de FLS2 somente encontra-se o pico do peptídeo, indicando que FLS2 não apresenta habilidade de fosforilar NIK1.

A interação do domínio cinase de BAK1 com o peptídeo sintético foi aplicado em um sistema UPLC acoplado a um Ion trap. Diferentemente do outro método, nesse é possível escolher diferentes modos de fragmentação para serem analisadas, assim como outras cargas adquiridas pelas moléculas. Através de dados de tempo de retenção a amostra é direcionada para um ionizador, no caso, um eletrospray, que permite sua migração para o detector. O detector Ion trap é caracterizado por apresentar regiões de aprisionamento da amostra durante um pequeno momento, com o intuito de intensificar o sinal de detecção de amostras que estão em baixa abundância. Assim, os dados obtidos foram submetidos contra um banco de dados através do software MASCOT que identificou com alta similaridade (51 ions score) que o peptídeo pertencia a NIK1. O resultado do MASCOT foi convertido para ser analisado no Scaffold® que obteve os dados da Figura 8, indicando que BAK1 fosforila o peptídeo P2, similarmente a NIK1 no resíduo de treonina 474.

a





c

...	B Ions	B+2H	C Ions	C+2H	AA	Y Ions	Y+2H	Z Ions	Z+2H	...
1	58,0		75,1		G	2.040,9	1.021,0	2.024,9	1.013,0	19
2	239,0		256,1		T+80	1.983,9	992,5	1.967,9	984,4	18
3	338,1		355,1		Y	1.802,9	901,9	1.786,9	893,9	17
4	395,1		412,2		G	1.703,8	852,4	1.687,8	844,4	16
5	532,2	266,6	549,2	274,6	H	1.646,8	823,9	1.630,8	815,9	15
6	645,3	323,1	662,3	331,2	I	1.509,7	755,4	1.493,7	747,4	14
7	716,3	358,7	733,3	366,7	A	1.396,7	698,8	1.380,6	690,8	13
8	813,4	407,2	830,4	415,2	P	1.325,6	663,3	1.309,6	655,3	12
9	942,4	471,7	959,4	479,7	E	1.228,6	614,8	1.212,6	606,8	11
10	1.105,5	553,2	1.122,5	561,2	Y	1.099,5	550,3	1.083,5	542,3	10
11	1.218,6	609,8	1.235,6	617,8	L	936,5	468,7	920,4	460,7	9
12	1.305,6	653,3	1.322,6	661,3	S	823,4	412,2	807,4	404,2	8
13	1.406,6	703,8	1.423,7	711,8	T	736,3	368,7	720,3	360,7	7
14	1.463,7	732,3	1.480,7	740,3	G	635,3	318,2	619,3	310,1	6
15	1.591,7	796,4	1.608,7	804,4	Q	578,3		562,3		5
16	1.678,7	839,9	1.695,8	847,9	S	450,2		434,2		4
17	1.765,8	883,4	1.782,8	891,4	S	363,2		347,2		3
18	1.894,8	947,9	1.911,8	955,9	E	276,2		260,1		2
19	2.040,9	1.021,0	2.058,0	1.029,0	K	147,1		131,1		1

Figura 8 - Espectro de massas da fragmentação do peptídeo sintético após interação com BAK1. a. Espectro MS1 da fragmentação do peptídeo sintético com m/z 2040 em MALDI-TOF/TOF. **b.** O gráfico mostra a fragmentação do peptídeo 2040 triplamente carregado, indicando a correspondência dos fragmentos com os resíduos. **c.** tabela de correspondência da fragmentação considerando os demais tipos de fragmentação. As cores vermelhas azuis e vermelhas indicam o pico encontrado e identificado na fragmentação $-b$ e $-y$, enquanto as cores verdes a fragmentação $-c$ e $-z$. Dados obtidos em *Scaffold® Proteome Software*

Nesse caso, o método monitorou o peptídeo triplamente carregado ($3H^+$), de modo que a razão m/z do espectro foi 680,3 e 653,3 para o peptídeo fosforilado e não fosforilado, respectivamente.

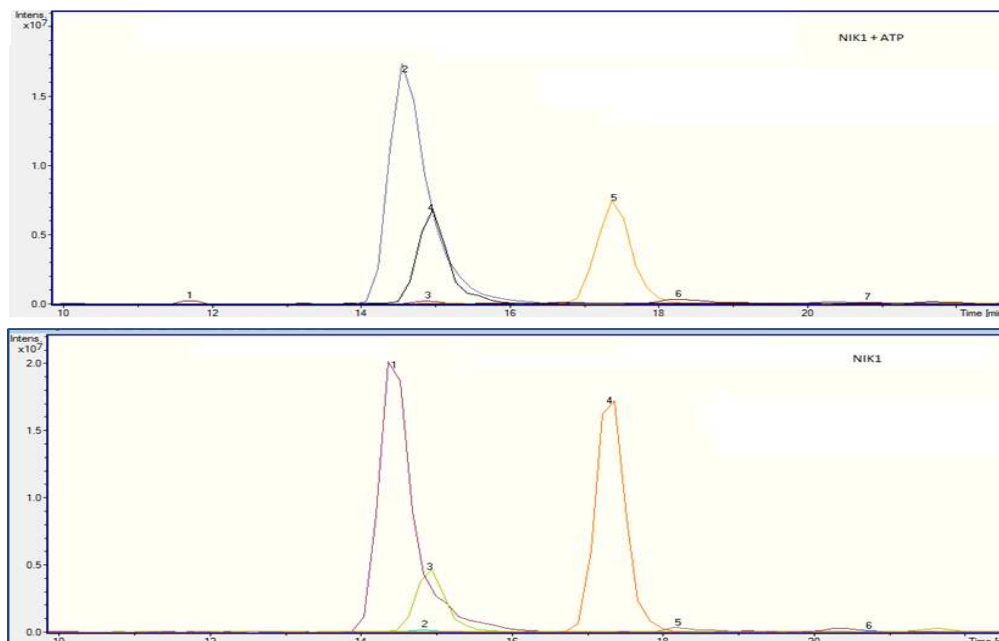
A identificação da presença do peptídeo sintético pelo software ocorre por estimativa da fragmentação. A diferença entre os principais picos identificados permite a primeira identificação da sequência de aminoácidos do peptídeo que está sendo analisado contra um banco de dados de Arabidopsis, permitindo classificar de qual proteína o peptídeo encontrado pertence. Porém, no caso apresentado, essa sequência contendo esse valor de massa fragmentada só poderia ser a indicada se esse peptídeo apresentasse uma fosforilação. Na parte inferior da tabela, é apresentado que não há

fosforilação em resíduos de serina ou treonina da extremidade carboxiterminal do peptídeo. Embora não tenha sido possível a identificação exata da fragmentação dos resíduos na extremidade amino, sabe-se que dentre os resíduos que restaram somente treonina poderia apresentar o grupo fosfato na sua cadeia lateral. Assim, é possível afirmar com alta confiança que a fosforilação de BAK1 no peptídeo sintético ocorre no resíduo T474. Da mesma forma, a fragmentação pelo ETD também permitiu a confirmação do resultado uma vez que a análise da fragmentação permite a liberação das cadeias laterais antes mesmo da fragmentação da cadeia peptídica, permitindo a identificação do íon fosfato perdido na fragmentação do aminoácido fosforilado.

BAK1 atua regulando a autofosforilação de NIK1 *in vitro*

Com base nas informações acima, ensaio de fosforilação *in vitro* foram conduzidos contendo os domínios cinase de NIK1 E BAK1 (KDNIK1 e KDBAK1, respectivamente) em mesma proporção. Considerando as propriedades bioquímicas de cinase das duas proteínas e que é comprovado pela capacidade de autofosforilação *in vitro* de NIK1, estabeleceu-se a relação de taxa de fosforilação do peptídeo alvo considerando tanto ele fosforilado quanto não fosforilado para dois principais peptídeos de NIK1: LLDHQDSHVTTAVR e GTVGHIAPEYLLSTGQSSEK para monitorar resíduo de treonina 469 e treonina 474, respectivamente.

a



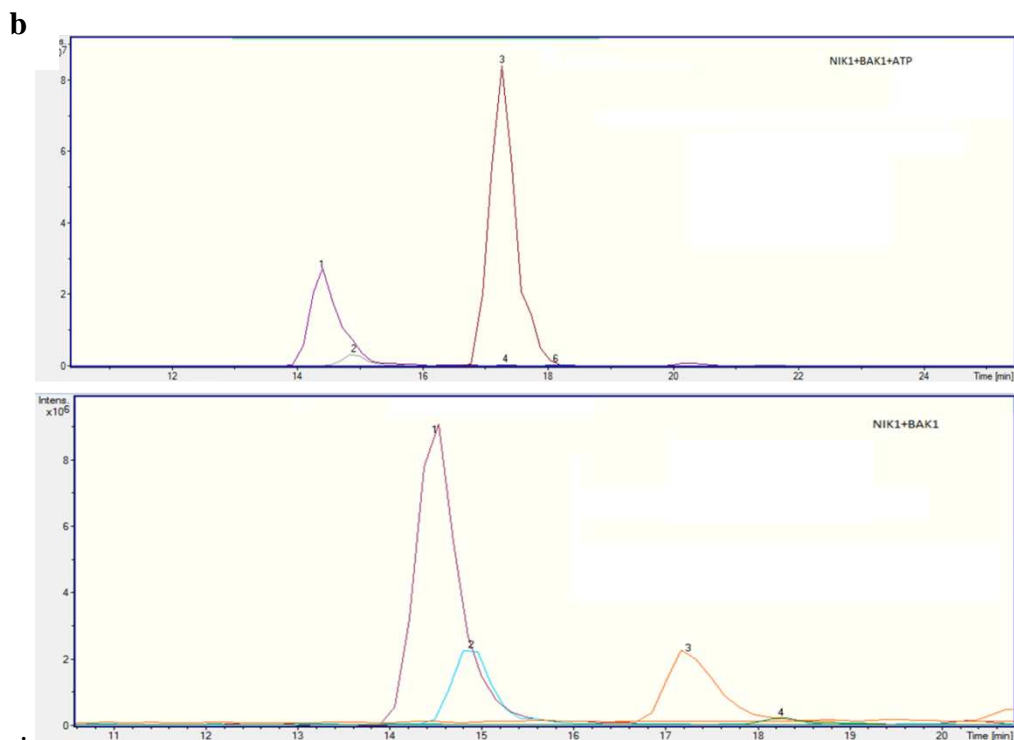


Figura 9 – Cromatograma extraído para os íons fosforilados e não fosforilados para os peptídeos LLDHQDSHVTTAVR e GTVGHIAPEYLTGQSSEK. A área sobre o gráfico permite estimar a abundância em solução do peptídeo no ensaio de fosforilação e que está sendo detectado pelo sistema. **a.** Cromatogramas do ensaio de fosforilação de KDNIK1 (acima) com a proteína purificada comparado com a proteína purificada apenas (abaixo). **b.** Cromatograma das interações de KDNIK1 e KDBAK1 a partir de ensaio de fosforilação (acima) e sem ensaio de fosforilação submetidas ao mesmo tempo de tratamento (abaixo).

O cromatograma obtido permite a visualização através do tempo de retenção e a identificação de cada peptídeo que está sendo monitorado, sendo possível estabelecer essa taxa através da integral da área do pico. Como primeiro alvo, buscou-se o monitoramento e verificação da alteração da fosforilação conforme o resultado obtido com o peptídeo sintético, ou seja, no resíduo T474 no peptídeo (GTVGHIAPEYLTGQSSEK) (Figura 9). Como observado acima, a relação entre os picos fosforilado e não fosforilado bastante próximos, com tempo de retenção 17.3 e 18.1 minutos, respectivamente, torna-se bastante acentuada quando se tem somente a proteína KDNIK1, confirmando a autofosforilação de NIK1 (Figura 9a, panel de cima). Porém os valores parecem alterados quando na presença de KDBAK1 (Figura 9b), onde o pico do peptídeo fosforilado é extremamente baixo, indicando que na presença do ATP, BAK1 parece controlar a autofosforilação de NIK1.

No outro tempo de retenção monitorado 14.4 e 14.9 minutos, nota-se, também, a redução da fosforilação do peptídeo em T469 no peptídeo LLDHQDSHVTTAVR, onde

é possível visualizar que a diferença entre os picos é bastante sutil na ausência de tampão de fosforilação e maior na situação em que KDNIK1 e KDBAK1 estão juntos na presença de ATP. Através da área do gráfico foi possível estimar a relação entre as abundâncias relativas, apresentada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 2 - Relação entre pico do peptídeo fosforilado e não fosforilado para o peptídeo LLDHQDSHVTTAVR.

Taxa de fosforilação - Relação entre pico fosforilado e não fosforilado (%)	
NIK1	16,52
NIK1 P	30,72
NIK1+BAK1	23,82
NIK1+BAK1P	9,29

A presença de ATP aumenta a taxa de fosforilação para o receptor KDNIK1, indicando sua autofosforilação. A presença de KDBAK1 interfere nas relações de fosforilação.

Tabela 3 - Relação entre pico do peptídeo fosforilado e não fosforilado para o peptídeo GTVGHIAPEYLSTGQSSEK .

Taxa de fosforilação - Relação entre pico fosforilado e não fosforilado (%)	
NIK1	2,44
NIK1 P	5,76
NIK1+BAK1	10,24
NIK1+BAK1P	0,34

A presença de ATP aumenta a taxa de fosforilação para o receptor KDNIK1, indicando sua autofosforilação. A presença de KDBAK1 interfere nas relações de fosforilação.

O fato de KDBAK1 ser um interferente da autofosforilação de NIK1 *in vitro* pode fornecer hipóteses de que esse co-receptor pode interagir com KDNIK1 nessa região do domínio cinase e atuar regulando a fosforilação de NIK1. Esse resultado é o primeiro indício de que a regulação entre as vias de resposta a begomovirus e o controle da resposta a PTI pode estar relacionado à interação que ocorre entre dois importantes receptores reguladores de respostas, sendo necessária a investigação de como ocorre o controle da ativação de cada via e do desligamento de cada receptor em cada situação.

NIK1 e NIK1-T474D interagem com BAK1 e FLS2 e regula a formação do complexo

Por conhecimentos prévios descritos na literatura, sabe-se que tanto NIK1 quanto BAK1 e FLS2 são proteínas RLKs transmembranas envolvidas em processos de sinalização celular contra agentes infecciosos. BAK1 e FLS2 têm o seu local de interação na membrana, porém essa é uma interação dependente de ligante (flg22). Os ensaios de fosforilação *in vitro* sugerem que NIK1 interage com BAK1. Para confirmar as possíveis interações entre os referidos receptores, foi utilizado o ensaio de complementação de fluorescência bimolecular (BiFC), que monitora, não somente interação entre proteínas *in vivo*, mas também é capaz de identificar a organela subcelular onde as interações ocorrem.

A complementação dos fragmentos de YFP fluorescentes, que foram mediadas pela interação entre FLS2 e BAK1, ocorreu na membrana plasmática de folhas de *N. benthamiana* transfectadas com as construções de DNA (Figura 10). Além disso, a formação dos complexos NIK1-FLS2 e NIK1-BAK1 ocorreu *in vivo*, independente da orientação das fusões de NIK1, FLS2 e BAK1 (N-terminal ou C-terminal de YFP), na ausência de ligantes e o sinal fluorescente reconstituído foi muito superior do que níveis de background (painéis controles com a combinação de fusões de proteínas com vetores vazios; Figuras 12 e 13). Coletivamente, estes resultados indicam FLS2 e NIK1 interagem constitutivamente de forma independente de ligante e independente de fosforilação por parte de FLS2. Similarmente, BAK1 também interage com NIK1 de forma constitutiva e independente de ligante; porém, BAK1 detém a capacidade de fosforilar NIK1 e de interferir com o processo de autofosforilação de NIK1.

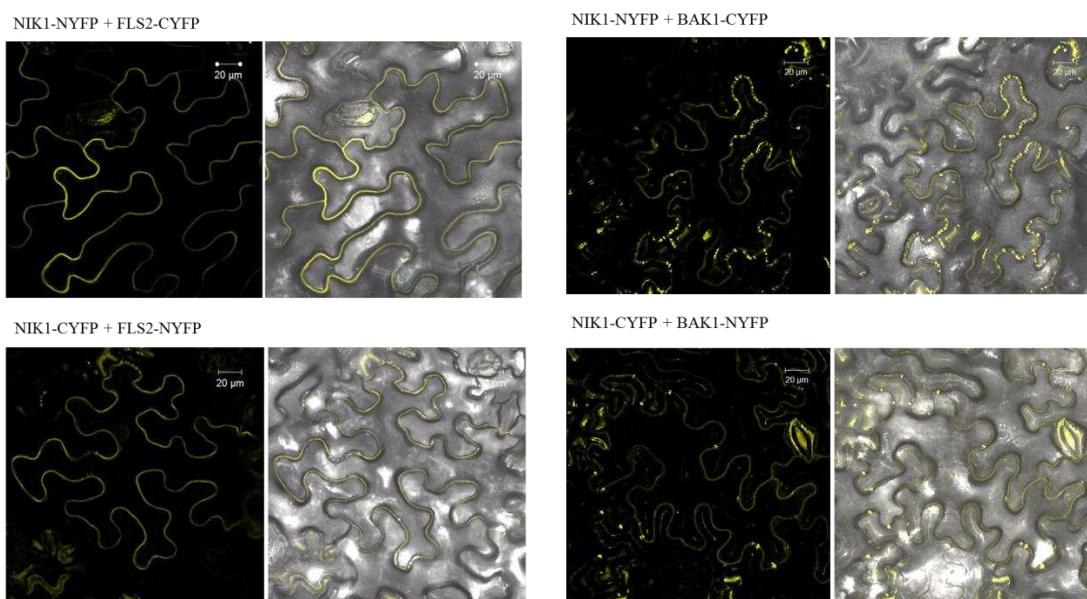


Figura 10 - NIK1 interage com FLS2 e BAK1 na membrana plasmática. Construções de DNA contendo os genes de interesse fusionados a fragmentos de YFP foram agroinfiltrados em folhas de *N. benthamiana* e a fluorescência reconstituída analisada por microscopia de confocal. **a.** Interação das fusões de NIK1 e FLS2 com fragmentos de YFP coexpressas em *N. benthamiana* após 72 horas da agroinfiltração. **b.** Interação das fusões NIK1 e BAK1 nas construções após 48 horas da agroinfiltração. Barras indicam 20 μm.

Foi observado que BAK1 apresenta a capacidade de fosforilar NIK1 no resíduo T474. Sabe-se que o mutante de NIK1 com o resíduo de treonina modificado para um resíduo de ácido aspártico (T474D) apresentando carga negativa constante, mimetizando a proteína NIK1 fosforilada. Dessa forma, considerando a importância desse resíduo na ativação da resposta a begomovírus, a avaliação de sua interação com as mesmas proteínas de membrana torna-se necessária para o entendimento da regulação frente a diferentes processos. Ensaio de BiFC utilizando o mutante NIK1-T474D demonstraram que a formação do complexo NIK1-T474D/FLS2 e NIK1-T474D/BAK1, ocorreu *in vivo*, independente da orientação das fusões de NIK1-T474D, FLS2 e BAK1 (N-terminal ou C-terminal de YFP, Figura 11), na ausência de ligantes e o sinal fluorescente reconstituído foi muito superior do que níveis de background (painéis controles com a combinação de fusões de proteínas com vetores vazios; Figuras 12 e 13), indicando que a fosforilação nesse resíduo não altera a interação entre os receptores na membrana (Figura 11).

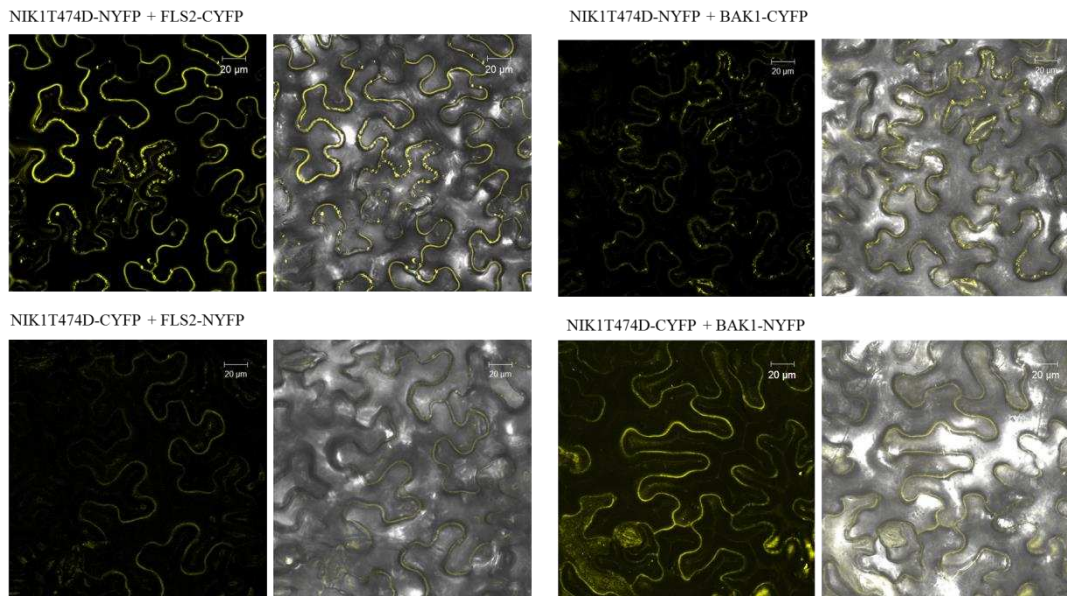


Figura 11 - O mutante NIK1T474D interage com FLS2 e BAK1 na membrana plasmática. Construções de DNA contendo os genes de interesse fusionados a fragmentos de YFP from agroinfiltrados em folhas de *n. benthamiana* e a fluorescência reconstituída analisada por microscopia de confocal. **a.** Interação das fusões de NIK1T474D E FLS2 coexpressas em benthamianas após 72 horas da agroinfiltração. **b.** Interação das fusões NIK1T474D e BAK1 nas construções após 48 horas da agroinfiltração. Barras indicam 20μm.

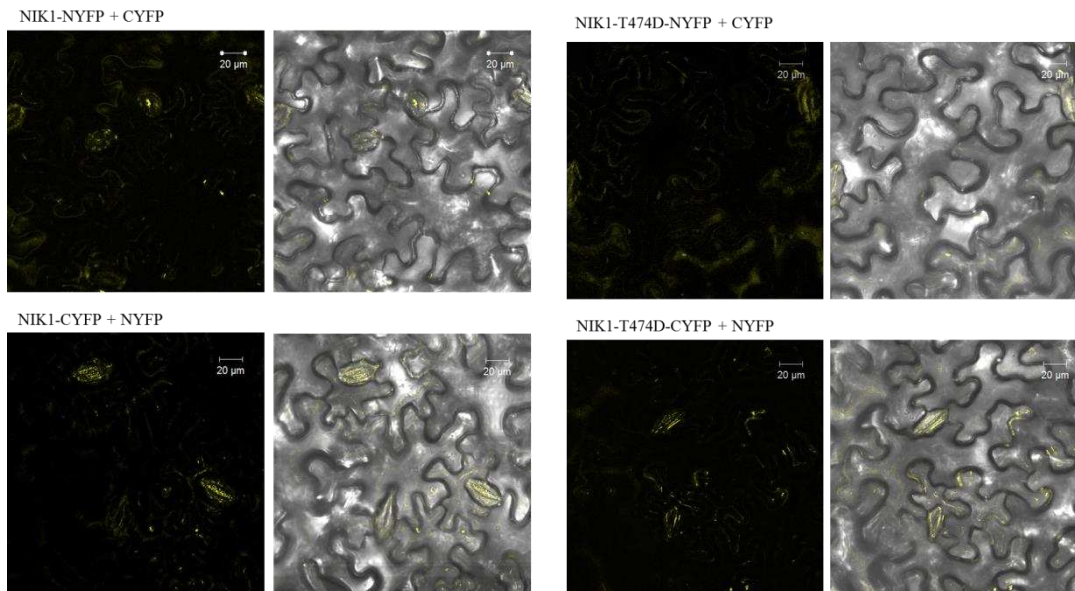


Figura 12. Resultados BiFC de controles associados com as Figuras 10 e 11

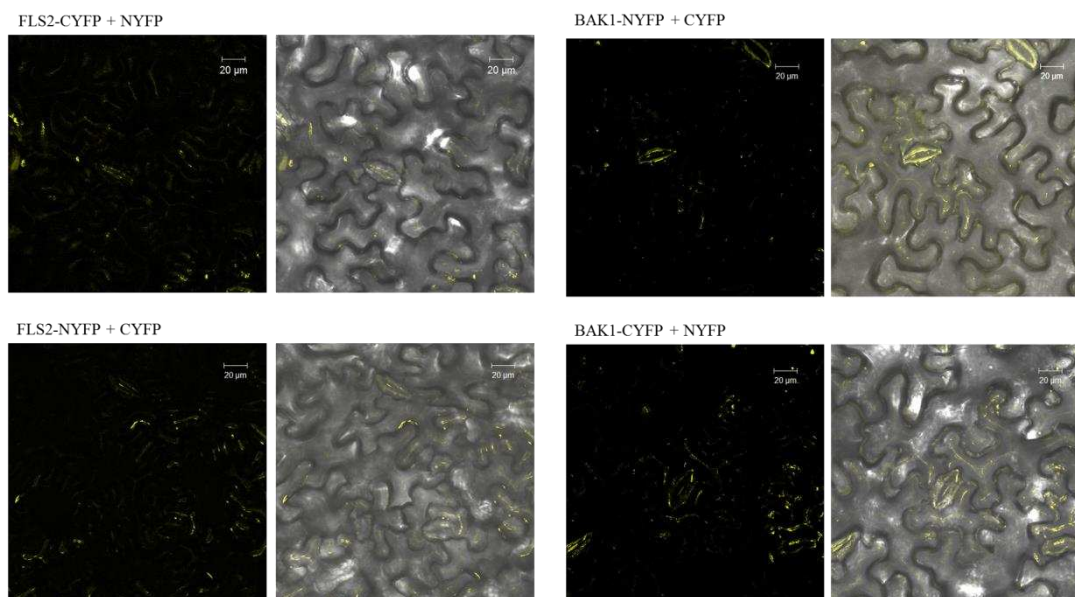


Figura 13 – Resultados de BiFC dos controles das construções para interações associados com as Figuras 10 e 11. As proteínas NIK1, NIK1-T474D, FLS2 e BAK1 foram expressas simultaneamente com os vetores não recombinados com nenhuma construção. Cada uma das interações foi avaliada com o vetor vazio correspondente.

A interação entre os receptores NIK1, BAK1 e FLS2 foi confirmado in vivo por meio de co-imunoprecipitação em protoplastos de *Arabidopsis thaliana* expressando NIK1-6HA e transformados para expressar transientemente os genes BAK1-FLAG e FLS2-GFP (Figura 14). Estes resultados demonstraram que NIK1 interage com FLS2 ou BAK1 em condições normais mas dissocia de ambos os receptores na presença de flagelina. A fim de verificar se a interação de NIK1 com os receptores BAK1 e FLS2 poderia interferir com a formação de um complexo imune ativo de BAK1 e FLS2, ensaios de co-imunoprecipitação foram realizados em protoplastos de *Arabidopsis*, superexpressando NIK1 ou silenciados para NIK1 e transfectados com construções de DNA para expressão transiente de FLS2 e BAK1 etiquetados com epitopos comerciais (Figuras 15a e 15b). Conforme esperado, em protoplastos não transformados com NIK1-HA (Col-0), a adição de flagelina promove a formação do complexo BAK1-FLS2 para iniciar PTI (Figura 15a). Entretanto, a superexpressão de NIK1 promove um decréscimo acentuado na formação do complexo FLS2-BAK1 induzido por flagelina, indicando que NIK1 impacta negativamente a formação de um complexo imune ativo. Assim, pode-se entender que ativação da resposta a PTI pelo reconhecimento do peptídeo bacteriano necessita do desligamento de NIK1 para ativação.

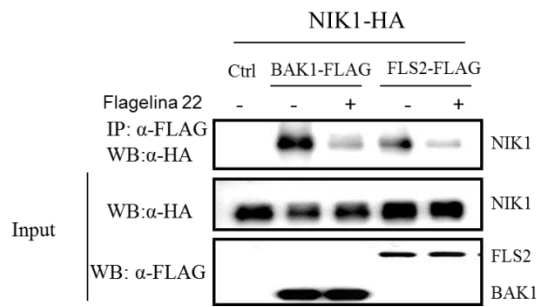


Figura 14 – Co-imunoprecipitação mostra que NIK1 interage com FLS2 e BAK1. a. O complexo NIK1-HA/BAK1-FLAG assim como o complexo NIK1-HA/FLS2-FLAG reduz sua interação na presença de 100nM de flg22.

Em contraste, em linhagens nocaute *nik1* há um aumento da formação do complexo de BAK1/FLS2 já na condição não tratada com flagelina, sendo semelhante à situação em Col-0 no tratamento com flagelina (Figura 15b). Estes resultados demonstram a relevância do receptor NIK1 no controle da formação do complexo imune ativo BAK1-FLS2 frente à resposta bacteriana.

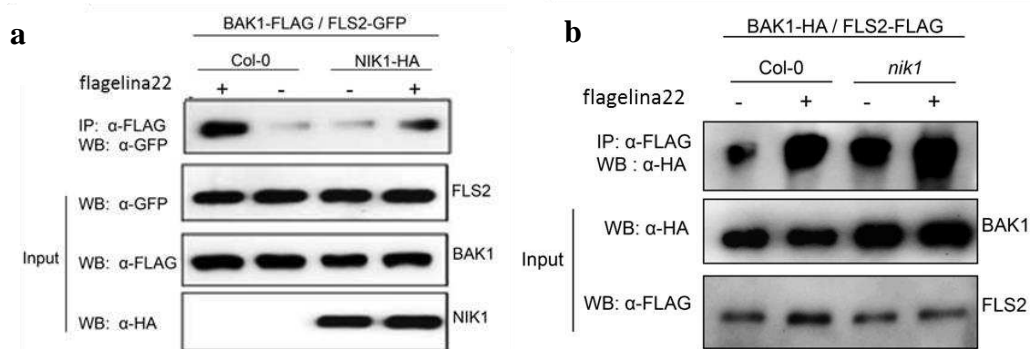


Figura 15 - NIK1 se apresenta como regulador negativo da formação do complexo BAK1/FLS2. a. A formação do complexo BAK1/FLS2 é reduzido na presença de superexpressão de NIK1 quando comparado a Col-0. b. Plantas nocautes de *nik1* apresentam maior formação do complexo BAK1/FLS2.

Recentemente, o estudo da ativação e desligamento de NIK1 foi avaliado tanto em plantas nocautes de *fls2* quanto de *bak1-4* no intuito de verificar, individualmente o comportamento de formação e desligamento de complexos. Foi demonstrado que em nocautes de *fls2*, a formação do complexo de NIK1/BAK1 não é alterada, em presença de flagelina, comparado com as plantas Col-0, em que flagelina promove a dissociação

de NIK1 do complexo NIK1-BAK1 (Elizabeth Fontes, comunicação pessoal). Similarmente, NIK1 não se dissocia de FLS2 na ausência de BAK1. Estes resultados indicam que a dissociação de NIK1 dos receptores imunes FLS2 e BAK1 requer a formação do complexo imune ativo FLS2-BAK1 dependente de flagelina. Considerando que foi demonstrado que BAK1 é capaz de fosforilar NIK1 e que a ativação da cinase BAK1 é dependente da formação do complexo ativo FLS2-BAK1, é plausível propor que a dissociação de NIK1 dos receptores BAK1 e FLS2 ocorre por fosforilação de NIK1 por BAK1. Coletivamente, estes resultados sugerem que, apesar da função positiva de NIK1 em imunidade antiviral, NIK1 participa como regulador negativo da imunidade inata antibacteriana em plantas.

CONCLUSÕES

Os resultados dessa investigação forneceram evidências conclusivas sobre o papel de NIK1 como regulador negativo de PTI mediada por BAK1 e FLS2, o que representa um avanço no nosso conhecimento com relação ao mecanismo responsável pela atenuação da ativação de PRRs que previne a sinalização constitutiva desses receptores e assim a resposta autoimune em plantas. Inicialmente, foi demonstrado que BAK1 e NIK1 interagem bioquimicamente, uma vez que foi demonstrado que BAK1 é capaz de fosforilar *in vitro* um peptídeo que corresponde à sequência da alça de ativação de NIK1. Além disso, BAK1 interfere com a atividade de autofosforilação de NIK1. Foi também demonstrado que, sob condições normais, NIK1 interage constitutivamente com FLS2 e BAK1, controlando a associação entre estes receptores e assim inibindo a ativação de PTI. Finalmente, dissociação de NIK1 dos receptores BAK1 e FLS2 depende de tratamento com flagelina, confirmando que flagelina promove uma mudança no equilíbrio entre os complexos de receptores, como um determinante de ativação da resposta imune antibacteriana. Entretanto, não se sabe se NIK1-FLS2 e NIK1-BAK1 age como complexos inibidores múltiplos ou complexos separados, o que constitui um questionamento a ser explorado como direção futura.

Baseado nos resultados dessa investigação associados com precedentes na literatura, é proposto um modelo para o mecanismo de comunicação cruzada entre a via de sinalização antiviral mediada por NIK1 e o sistema de imunidade antibacteriana (Figure 16). Na ausência de infecção viral e bacteriana, NIK1 permanece ligado a FLS2 e BAK1, prevenindo a ativação de uma resposta autoimune. Ataque por pseudomonas promove a associação de flagelina com FLS2, o que resulta no recrutamento de BAK1 em um complexo imune que ativa PTI. NIK1 controla a formação do complexo FLS2-BAK1, uma vez que a eficiência de formação do complexo imune depende da concentração basal de NIK1. Ativação da resposta imune é principalmente devido à formação do complexo BAK1-FLS2 estimulado por flagelina, porque a dissociação de NIK1 de BAK1 ou de FLS2 requer a presença do outro parceiro de sinalização. Portanto, a dissociação de NIK1 depende da formação do complexo imune BAK1-FLS2 ativado que deve promover a fosforilação de NIK1. Consistente com esta interpretação foi demonstrado que BAK1, mas não FLS2, é capaz de fosforilar NIK1 *in vitro*. Na presença de infecção viral NIK1 homodimeriza ou heterodimeriza para transduzir um

sinal antiviral que culmina com a supressão de tradução global de mRNAs do hospedeiro e virais, resultando em uma estratégia de defesa contra vírus de DNA em células vegetais. Este modelo implica que a infecção bacteriana prévia poderia liberar NIK1 fosforilado na posição 474 e, conseqüentemente, ativar uma resposta antiviral de defesa na planta, comprometendo a infecção viral posterior. Já foi demonstrado previamente que a infecção com fungo protege a planta contra infecção de vírus de RNA por ativar PTI (Iriti and Varoni, 2014). Nesta investigação, é proposta que a infecção com bactéria poderia proteger a planta contra infecção por begomovirus, um grupo de vírus constituído de DNA cadeia simples, que infecta uma grande variedade de culturas agronomicamente relevantes e constitui uma séria limitação à produtividade agrícola e segurança alimentar mundialmente.

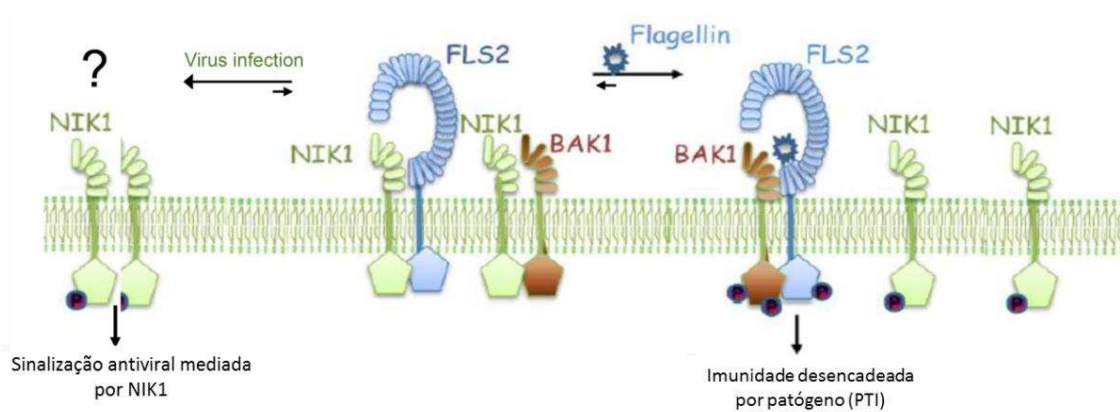


Figura 16 – Modelo da regulação inversa da resposta imune antibacteriana e antiviral de NIK1. Em condições normais, NIK1 interage com FLS2 e BAK1 regulando o complexo na prevenção de autoimunidade. Após o tratamento com flagelina, é formado o complexo heterodimérico BAK1/FLS2 ativando a via de sinalização de imune desencadeada por patógeno (PTI) e NIK1 é desligada de ambas. Por outro lado, a infecção por vírus promove a formação de um complexo com a própria NIK1 ou com outra proteína ainda desconhecida, levando a ativação da via de sinalização antiviral mediada por NIK1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, M. (2013). Peptides as triggers of plant defence. **Journal of Experimental Botany**, 64(17), 5269–5279.
- Bent, A. (2006). Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), 343(1), 87–103
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular Plant**, 8(4), 521–539.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, 60(1), 379–406.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254.
- Brustolini, O. J. B., Machado, J. P. B., Condori-Apfata, J. A., Coco, D., Deguchi, M., Loriato, V. A. P., ... Fontes, E. P. B. (2015). Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. **Plant Biotechnology Journal**, 13(9), 1300–1311.
- Calil, I. P., & Fontes, E. P. B. (2016). Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. **Annals of Botany** 119: 711-723,.
- Carvalho, C. M., Santos, A. A., Pires, S. R., Rocha, C. S., Saraiva, D. I., Machado, J. P. B., ... Fontes, E. P. B. (2008). Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against virus. **PLoS Pathogens**, 4(12).
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., & Kemmerling, B. (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. **Trends in Plant Science**, 14(10), 535–541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., ... Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, 448(7152), 497–500.

- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F., Waclawovsky, a J., & Chory, J. (2004). The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. **Genes & Development**, 18, 2545–2556.
- Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A., & Fontes, E. P. B. (2017). Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. **Frontiers in Microbiology**, 7, 1–14.
- Iriti, M., & Varoni, E. M. (2015). Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants HAMPs or DAMPs. **Environ Sci Pollut Res** 22: 2935–2944.
- Lin, W., Lu, D., Gao, X., Jiang, S., Ma, X., Wang, Z., ... Shan, L. (2013). Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(29), 12114–12119.
- Liu, J., Chen, S., Chen, L., Zhou, Q., Wang, M., Feng, D., ... Liu, B. (2017). BIK1 cooperates with BAK1 to regulate constitutive immunity and cell death in Arabidopsis. **Journal of Integrative Plant Biology**, 59(4), 234–239.
- Ma, X., Xu, G., He, P., & Shan, L. (2016). SERKING Coreceptors for Receptors. **Trends in Plant Science**, 21(12), 1017–1033.
- Machado, J. P. B., Brustolini, O. J. B., Mendes, G. C., Santos, A. A., & Fontes, E. P. B. (2015). NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? **BioEssays**, 37(11), 1236–1242.
- Mariano, A. C., Andrade, M. O., Santos, A. A., Carolino, S. M. B., Oliveira, M. L., Baracat-Pereira, M. C., ... Fontes, E. P. B. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. **Virology**, 318(1), 24–31.
- Nam, K. H., & Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. **Cell**, 110(2), 203–212.
- Nicaise, V. (2015). Lost in translation: An antiviral plant defense mechanism revealed. **Cell Host and Microbe**, 17(4), 417–419.

Rocha, C. S., Santos, A. A., Machado, J. P. B., & Fontes, E. P. B. (2008). The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. **Virology**, 380(2), 165–169.

Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2001). Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus. **Virology**, 291(1), 110–125.

Sakamoto, T., Deguchi, M., Brustolini, O. J. B., Santos, A. A., Silva, F. F., & Fontes, E. P. B. (2012). The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. **BMC Plant Biology**, 12, 229.

Santos, A. A., Carvalho, C. M., Florentino, L. H., Ramos, H. J. O., & Fontes, E. P. B. (2009). Conserved threonine residues within the A-loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. **PLoS ONE**, 4(6).

Shiu, S., Karlowski, W., & Pan, R. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. **The Plant Cell**, 16, 1220–1234.

Stangarlin, J. R. 1; Kuhn, O. J.; Toledo, M. V.; Portz, R. L.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Pascholati, S. F. (2011). A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, 10, 18–46.

Sun, Y., Han, Z., Tang, J., Hu, Z., Chai, C., Zhou, B., & Chai, J. (2013). Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. **Cell Research**, 23(11), 1326–1329.

Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M. B., ... Clouse, S. D. (2008). Sequential Transphosphorylation of the BRI1/BAK1 Receptor Kinase Complex Impacts Early Events in Brassinosteroid Signaling. **Developmental Cell**, 15(2), 220–235.

Wang, Y., Li, Z., Liu, D., Xu, J., Wei, X., Yan, L., ... Shui, W. (2014). Assessment of BAK1 activity in different plant receptor-like kinase complexes by quantitative profiling of phosphorylation patterns. **Journal of Proteomics**, 108, 484–493.

Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. **Nature Protocols**, 2(7), 1565–1572.

Zhang, M., & Coaker, G. (2017). Harnessing Effector-Triggered Immunity for Durable Disease Resistance. **Phytopathology** 567, 1–8.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. **Cell**, 125(4), 749–760.

Zorzatto, C., Machado, J. P. B., Lopes, K. V. G., Nascimento, K. J. T., Pereira, W. A., Brustolini, O. J. B., ... Fontes, E. P. B. (2015). NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. **Nature**, 520(7549), 679–682.