

MARCO AURÉLIO FERREIRA

**NIK1 (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASE*), UM NOVO
COMPONENTE DA VIA DE RESPOSTA A BRASSINOSTERÓIDES**

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
2016

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

T

F383n
2016
Ferreira, Marco Aurélio, 19-
NIK1 (Nuclear Shuttle Protein Interacting Kinase), um
novo componente da via de resposta a brassinosteroides / Marco
Aurélio Ferreira. – Viçosa, MG, 2016.
vii, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.42-52.

1. Biologia molecular. 2. Vírus de plantas. 3. Proteínas.
4. Brassinosteroides. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

MARCO AURÉLIO FERREIRA

**NIK1 (*NUCLEAR SHUTTLE PROTEIN-INTERACTING KINASE*), UM NOVO
COMPONENTE DA VIA DE RESPOSTA A BRASSINOSTERÓIDES**

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: 27 de julho de 2016.

João Paulo Batista Machado

Pedro Augusto Braga dos Reis

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e saúde durante a realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio.

À professora Elizabeth pela orientação, acolhimento e aprendizado nestes anos.

Aos colegas de laboratório que ajudaram nos experimento, e que tornaram os dias de trabalho mais prazerosos.

Aos amigos que estiveram sempre presentes e ajudaram com conselhos em momentos difíceis nesta trajetória.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas oportunidades de estudo e aprendizado que contribuíram muito para meu crescimento.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Receptores do tipo cinases (RLKs) em plantas.....	4
Proteína NIK1 (<i>NSP-Interacting Kinase 1</i>).....	5
BAK1 (<i>Brassinosteroid Insensitive Associated Kinase 1</i>).....	9
BRI1 (<i>Brassinosteroid-insensitive 1</i>).....	11
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
Extração de DNA plasmidial.....	16
Clonagem de proteínas quiméricas.....	16
Material vegetal, condições de crescimento e obtenção de plantas transgênicas	19
Ensaio de crescimento de hipocótilo.....	20
Extração de RNA e preparo de cDNA.....	21
Análises de qRT-PCR.....	22
Transformação de leveduras e teste de duplo híbrido.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
Proteínas quiméricas por troca dos domínios cinase e LRR entre BAK1 e NIK1 são corretamente expressas e localizadas na membrana plasmática em linhagens transgênicas.....	25
As proteínas quiméricas exibem transdominância negativa sob BAK1, indicando que domínios de NIK1 podem interferir negativamente com desenvolvimento.....	28
O efeito negativo de NIK1 no desenvolvimento está associado ao seu impacto na via de sinalização por BR.....	32
Interação entre os domínios de cinase de BRI1 e NIK1 em leveduras	37
CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

FERREIRA, Marco Aurélio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **NIK1 (*Nuclear shuttle protein-interacting kinase*), um novo componente da via de resposta a brassinosteróides.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Anésia Aparecida dos Santos, Welison Andrade Pereira e Michihito Deguchi.

O receptor LRR-RLK (*Leucine-rich repeat receptor-like kinase*), designado NIK1 (*NSP-interacting kinases*), está envolvido na resposta imunológica em plantas contra Germinivirus. NIK1 foi inicialmente descrito por interagir com a proteína viral NSP (*nuclear shuttle protein*), proteína que participa do transporte de DNA viral do núcleo para o citoplasma de células infectadas. Com alta similaridade estrutural a NIK1, BAK1 (*Brassinosteroid Insensitive Associated Kinase1*), também conhecida como SERK3 (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase3*), é um receptor LRR-RLK de membrana que desempenha um duplo papel em vias de sinalização, podendo atuar como um coreceptor de BRI1 na presença de BR ou mediar respostas de defesa contra patógenos. Na via de crescimento desencadeada por brassinosteróides (BRs), BAK1 interage com BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive1*) na membrana plasmática e ativa a função de cinase desta proteína. Recentemente, através de dados de RNA-seq, foi demonstrado que inativação da função de NIK1 no nocaute *nik1* (Salk_060808) induz a expressão de genes envolvidos na resposta a BRs e desenvolvimento, indicando uma possível comunicação cruzada entre a via de sinalização antiviral mediada por NIK1 e vias de sinalização de desenvolvimento. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel de NIK1 na via de resposta a BRs. *Arabidopsis thaliana*, linhagem *nik1* nocaute, foi transformada com as construções de DNA 35S:BAK-NIK1_GFP e 35S:NIK1-BAK1_GFP, sendo que a expressão dos transgenes e localização subcelular na membrana das proteínas quiméricas foram confirmadas por RT-PCR e microscopia confocal, respectivamente. Análises fenotípicas de plantas expressando as construções quiméricas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 indicaram deficiência na via de desenvolvimento induzido por BR, uma vez que o fenótipo destas plantas transgênicas se assemelharam muito ao mutante *bak1-4*, deficiente na sinalização por BR. Além disso, a ativação da via de sinalização por BRs foi avaliada por meio de crescimento de hipocótilo e de análise da expressão de genes marcadores induzidos por brassinolídeo (BL). Em *nik1*, o tratamento com BL estimulou o crescimento do hipocótilo e induziu

genes marcadores associados à sinalização por BR, embora em menor intensidade do que em Col-0, indicando funcionamento da via de desenvolvimento induzida por BR nesta linhagem nocaute. Expressão de ambas as proteínas quiméricas em *nik1* mutante, que expressa os genes *BAK1* e *BRI1* normalmente, restaurou o fenótipo insensível a BL, típico do nocaute *bak1-4*. Claramente, a expressão dos genes quiméricos interferiu negativamente com a via de sinalização de BR, uma vez que nas linhagens transgênicas, BL não estimulou o alongamento do hipocótilo e tampouco a indução da expressão de genes marcadores associados à via de sinalização de BR. Estes resultados indicam que as proteínas quiméricas atuam como alelos mutantes transdominantes negativos na sinalização por BR. Esta hipótese foi fundamentada pela capacidade de NIK1 de interagir com BAK1, conforme previamente demonstrado, e com o domínio cinase de BRI1, demonstrado nesta investigação por meio de duplo híbrido em leveduras. Embora não se tenha observado uma ativação aumentada da resposta a BR no nocaute *nik1*, provavelmente devido a redundância funcional da subfamília NIK, os fenótipos resultantes da expressão das proteínas quiméricas, contendo ou o domínio LRR ou o domínio de cinase de NIK1, sugerem que NIK1 atue como um regulador negativo da sinalização por BR.

ABSTRACT

FERREIRA, Marco Aurélio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **NIK1** (Nuclear shuttle protein-interacting kinase), **a new component of the brassinosteroid response pathway**. Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Anésia Aparecida dos Santos, Welison Andrade Pereira and Michihito Deguchi.

The LRR-RLK (Leucine-rich repeat receptor-like kinase) NIK1 (NSP-interacting kinase), is known to mediate immune response in plants against Germinivirus. NIK1 was initially described by interacting with the viral protein NSP (Nuclear shuttle protein), a protein that participates in viral DNA transport from the nucleus to the cytoplasm of infected cells. With high structural similarity with NIK1, BAK1 (Brassinosteroid Insensitive-Associated Kinase1), also known as SERK3 (Somatic embryogenesis receptor Kinase3), is a membrane LRR-RLK, which plays a dual role in signaling pathways and may act as a co-receptor of BRI1 in the presence of brassinosteroid (BR) or mediate defense responses against pathogens. In the BR-triggered growth pathway, BAK1 interacts with BRI1 (Brassinosteroid-Insensitive1) in the plasma membrane and activates the kinase function of this protein. Recently, RNA-seq data revealed that inactivation of NIK1 function in the *nik1* mutant (Salk_060808), caused an up-regulation of genes involved in response to BRs and development, indicating a possible cross-talk between the NIK1-mediated antiviral signaling pathway and development signaling pathways. The goal of this investigation was to evaluate the role of NIK1 in the BR response pathway. *Arabidopsis thaliana*, *nik1* line, was transformed with the DNA constructs 35S:BAK-NIK1_GFP and 35sNIK1-BAK1_GFP, and the expression of the transgenes and subcellular localization of the chimeric proteins were confirmed by RT-PCR and confocal microscopy, respectively. BAK1-NIK1- and NIK1-BAK1-expressing plants displayed a deficiency in the BR-induced growth pathway, as the phenotypes of these transgenic lines resemble the ones of the BR signaling deficient *bak1-4* mutant. Furthermore, the activation of BR signaling was evaluated through brassinolide (BL)-induced hypocotyl growth and gene expression of BR signaling-associated marker genes. BL-induced stimulation of hypocotyl elongation and induction of marker genes were observed in *nik1*, although to a lesser extent than in Col-0, indicating a functional BR signaling in this knockout line. Expression of both chimeric proteins in the *nik1* mutant, which harbors *BAK1* and *BRI1* normal genes, mimicked the BL insensitive phenotype, typical of the *bak1-4* knockout. Clearly, the

expression of the chimeric genes impacted negatively the BR signaling, as in the transgenic lines, the BL treatment did not stimulate hypocotyl growth or the induction of BR signaling marker genes. These results indicate that the chimeric proteins function as transdominant negative mutant alleles in BR signaling. This hypothesis was substantiated by the capacity of NIK1 to interact with BAK1, as previously demonstrated, and with the BRI1 kinase domain, as demonstrated in the present investigation through a two-hybrid assay in yeast. Although *nik1* did not display an enhancement of the BR-induced responses, most likely due to the functional redundancy of the NIK subfamily, the resulting phenotypes of the chimeric genes expression, harboring either the NIK1 LRR or kinase domain, implicate NIK1 as a negative regulator of BR signaling.

INTRODUÇÃO

Os receptores imunes NIKs (*Nuclear Shuttle Protein-Interacting Kinases*) foram inicialmente identificados como alvos de virulência da proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) de begomovirus (Fontes *et al.*, 2004, Mariano *et al.*, 2004). NIKs são estruturalmente organizados como receptores do tipo cinase (RLKs), contendo um domínio extracelular com repetições de leucina (LRR), seguido de um segmento transmembrana e um domínio serina/treonina cinase voltado para o citossol (Sakamoto *et al.*, 2012). Inativação do gene *NIK1* aumenta a susceptibilidade à infecção por begomovirus e ativação constitutiva de NIK1 confere tolerância ao vírus (Brustolini *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2008 Fontes *et al.*, 2004). Além disso, ligação de NSP ao domínio cinase do receptor NIK1 suprime a atividade cinase e a propagação do sinal antiviral, aumentando a patogenicidade do vírus ao hospedeiro.

O modelo mecanístico da via de sinalização antiviral mediada por NIK1 preconiza que em resposta à infecção viral, NIK1 dimeriza-se possibilitando a trans-autofosforilação de um resíduo de treonina chave na posição 474, o que causa a ativação da cinase (Santos *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010). NIK1 ativado intermedia a fosforilação da proteína ribossomal L10 (RPL10), sendo translocada para o núcleo onde interage com LIMYB (*RPL10-Interacting Myb Domain-Containing Protein*) para reprimir a expressão de genes relacionados com a maquinaria de tradução (Carvalho *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2008; Zorzato *et al.*, 2015). Repressão prolongada desses genes relacionados com tradução leva a uma supressão global da tradução de mRNAs do hospedeiro e do vírus (Brustolini *et al.*, 2015; Zorzato *et al.*, 2015). Conseqüentemente, esta supressão global de tradução fundamenta o mecanismo molecular envolvido na defesa antiviral mediada por NIK1.

A configuração de receptor de NIK1 é similar à organização estrutural de SERKs (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinases*), que, como NIKs, pertencem à subfamília II de RLKs, contendo cinco repetições ricas em leucina (LRR) no domínio extracelular (LRR-II-RLK) (Albrencht *et al.*, 2008; Fontes, *et al.*, 2004). Esta subfamília II de LRR-RLKs é dividida em (i) um *cluster* de cinco SERKs (SERK1-5), (ii) um *cluster* de receptores de funções desconhecidas e (iii) um *cluster* de receptores NIKs (NIK1-3); (Diévert e Clark, 2004; Fontes *et al.*, 2004). Entre SERKs, BAK1 (*Brassinosteroid Insensitive1 (BR1)- Associated Kinase1*), também designado AtSERK3, é o membro da subfamília mais bem caracterizado e funciona como um co-

receptor envolvido tanto em imunidade contra bactérias e fungos quanto em desenvolvimento. De fato, BAK1 foi inicialmente identificado como co-receptor modulando a ativação do receptor BRI1 dependente da interação com brassinosteróide (BR); (Li *et al.*, 2002; Nam e Li., 2002). O receptor BRI1 percebe e liga ao hormônio de crescimento para regular crescimento e desenvolvimento de plantas. BRs controlam processos fisiológicos e de desenvolvimento, como alongamento do caule, diferenciação vascular, tamanho da semente, fertilidade, tempo de florescimento, senescência e resistência a estresses bióticos e abióticos (Taiz e Zaiger 2013).

Na via de desenvolvimento desencadeada por sinalização a BR, brassinolídeo (BL), o BR mais ativo, se liga ao domínio extracelular de BRI1, que possui configuração de receptor de membrana do tipo LRR-RLKs, contendo 23 repetições de leucinas no domínio extracelular (Li e Chory 1997). Esta associação induz a dimerização de BRI1 com BAK1 (Li *et al.*, 2002; Nam e Li, 2002). Reações de transfosforilação entre BRI1 e BAK1, induzidas pela presença do BL, promovem a fosforilação de BSKs (*BR Signaling Kinases*); (Tang *et al.*, 2008) que ativam a proteína BSU1 fosfatase (*BRI1-Suppressor1*) (Mora-Garcia *et al.*, 2004). BSU1 fosfatase desfosforila, e, conseqüentemente, inativa BIN2 (*BR Insensitive2*), uma cinase GSK3-*Like* que regula negativamente a via de resposta a BR, por meio de degradação proteossomal. Isto permite o acúmulo dos fatores de transcrição desfosforilados BZR1 e BZR2/BES1 no núcleo (Peng *et al.*, 2008; Vert e Chory, 2006), e conseqüentemente a transativação de genes relacionados à via de resposta a BRs (Yin *et al.*, 2005).

Outros membros da subfamília LRR-RLK, como BAK7/SERK4 e SERK1 podem atuar regulando positivamente a via de sinalização a BR. BAK7/SERK4 pode atuar de maneira redundante a BAK1 (Jeong *et al.*, 2010). A proteína SERK1 também interage com BRI1, sendo que o hormônio esteróide BR age como um intensificador da estabilidade do complexo BRI1-SERK1, interagindo com ambos (Henzler e Hothorn, 2013; Karlova *et al.*, 2006; Santiago *et al.*; 2013).

A sinalização a BR está também sujeita a regulação negativa em diversos níveis para assegurar a especificidade e a extensão com que a via de sinalização é ativada. Reguladores negativos da via de sinalização a BR incluem as proteínas BIK1 (*Botrytis-Induced Kinase1*), TTL (*Transthyretin-like Protein*) e a proteína 14-3-3 (Jeong *et al.*, 2010). A proteína BIK1, inicialmente identificada por mediar a resistência de plantas a fungos patógenos necrotróficos (Veronese *et al.*, 2006), também se associa com o receptor BRI1 e regula negativamente a via de BR. BIK1 interage com BRI1 e só se

dissocia do mesmo quando há a ligação do BL, que resulta na fosforilação de BIK1 por BRI1 (Lin *et al.*, 2013).

A proteína de membrana TTL interage com o receptor BRI1, e é fosforilada por ele. Plantas mutantes e plantas superexpressando TTL se assemelham com as de BKI1 (*BRI1 Kinase Inhibitor 1*) um outro regulador negativo da via ativada por BRs; as plantas mutantes são maiores, e as que superexpressam estes genes são semi-anãs, demonstrando inibição destes genes na via de BR. No entanto, diferentemente de BSK1, TTL interage fortemente com o domínio cinase ativo de BRI1, mais que o inativo, sugerindo que TTL pode inibir a sinalização do BRI1 após sua ativação (Wang e Chory, 2006). Finalmente, a proteína 14-3-3 (proteína de ligação a fosfopeptídeo) interage com BZR1 e BZR2/BES1, mantendo estes fatores de transcrição fosforilados no citoplasma (Gampala *et al.*, 2007).

Embora BAK1, SERK1 e SERK4 estejam envolvidas na via de desenvolvimento mediada por BRs, uma possível função de NIK1 em desenvolvimento ainda não foi avaliada. Recentemente, foi demonstrado que a inativação do gene *NIK1* induz a expressão de reguladores positivos de desenvolvimento, envolvidos no controle de desenvolvimento, diferenciação de células-tronco, florescimento e diferenciação celular (Machado *et al.*, 2015). Estes resultados associados à similaridade de configuração estrutural entre SERKs e NIKs levantaram a hipótese de que NIK1 poderia modular negativamente a via de sinalização a BRs. Nesta investigação, é demonstrado que a inativação de *NIK1* aumenta a hipersensibilidade a BR no nocaute *nik1*, sugerindo que NIK1, ao contrário de BAK1, atua como modulador negativo da via de sinalização a BR, provavelmente por meio de interação com BRI1. Utilizando o ensaio de duplo híbrido em leveduras, foi demonstrado que o domínio cinase de NIK1 interage com o domínio cinase de BRI1. A modulação negativa da via de sinalização por BR é aumentada por expressão da proteína quimérica BAK1-NIK1, que contém o domínio extracelular LRR de BAK1 e o domínio cinase de NIK1. Estes resultados sugerem que NIK1 interage com BRI1 para modular negativamente a via de sinalização de BRs, através do domínio cinase.

REVISÃO DE LITERATURA

Receptores do tipo cinases (RLKs) em plantas

Os receptores de sinalização em plantas constituem um grande grupo e são subdivididos em receptores histidino-cinase, receptores acoplados a proteína G (GPCRs), fotorreceptores, receptores com repetições ricas em leucina (LRRs) de resistência contra determinados patógenos e receptores Serina/Treonina cinase, designados RLKs (McCarty e Chorry, 2000).

Em *Arabidopsis thaliana*, RLKs formam uma família monofilética que contém mais de 610 membros, que incluem receptores cinases e receptores citoplasmáticos que se assemelham à cinases (RLCK) (Shiu e Bleecker, 2003; Liu *et al.*, 2009). Na família de genes RLKs de *A. thaliana*, mais de 400 membros possuem uma configuração estrutural que se assemelha a receptores transmembranas (Shiu e Bleecker, 2001) e são denominados receptores cinases transmembranas de plantas (PRKs); (Diévert e Clark, 2004). Estes receptores transmembranas são definidos como proteínas que contêm um domínio extracelular, um domínio unipasso na membrana e um domínio citoplasmático serina/treonina cinase (Diévert e Clark, 2004; Lin *et al.*, 2014). Com isso, sugere-se que tais receptores estejam envolvidos na percepção de sinais na superfície celular da planta a ligantes extracelulares (Shiu e Bleecker, 2001).

As proteínas LRR-RLK representam um grande número de PRKs no genoma de *A. thaliana*, com 216 membros e possuem um domínio extracelular composto de motivos ricos em leucina organizados em sequência e um domínio cinase intracelular (Yin *et al.*, 2002). As proteínas LRR-RLK em *A. thaliana* representam 13 subfamílias (LRR I a XIII) e são classificadas de acordo com seu domínio extracelular LRR (Diévert e Clark, 2004). Todas LRR-RLKs analisadas em plantas apresentaram atividade funcional no seu domínio cinase (Diévert e Clark, 2004). Contudo, apesar do grande número de LRR-RLK em plantas, apenas alguns poucos têm função conhecida, dentre estes pode-se citar: CLAVATA1, receptor associado ao controle da proliferação apical do meristema (Diévert *et al.*, 2004), ERECTA, envolvido com iniciação, alongação dos órgãos e defesa (Godiard *et al.*, 2003), BRI1, um dos membros mais estudados desta família, envolvido na resposta a BRs (Bishop e Kong, 2002; Li *et al.*, 2002), SERKs, os quais são marcadores de embriogênese somática e possuem função de defesa (Albrencht *et al.*, 2008), HAESA, envolvido com abscisão floral (Jin *et al.*, 2000), FLS2, receptor da

flagelina (Gómez- Gómez e Boller, 2000), EFR, receptor relacionado a resposta imune em plantas (Zipfel, *et al.*, 2006) e SYMRK, envolvidos com simbiose (Markmann *et al.*, 2008).

Os receptores LRR-RLK tem sua atividade catalítica ativada quando um ligante ou molécula sinal interage com seu domínio extracelular. Após a ativação, ocorre a fosforilação do domínio cinase citoplasmático via autofosforilação, homodimerização ou heterodimerização, permitindo que o receptor interaja com outra proteína alvo e a ative por fosforilação. Porém, poucos RLKs de plantas tiveram o seu ligante identificado e os mecanismos moleculares pelo quais estes receptores tem sua atividade regulada, com exceção de uns poucos RLKs. Dentre os mecanismos que podem regular a atividade de um RLK, podemos citar hetero-oligomerização induzida pela interação RLK-ligante, sendo o heterodímero formado entre o receptor de BR, BRI1, e BAK1 um exemplo típico. A inibição da sinalização citoplasmática ativada por RLKs através da ação de proteínas fosfatases; inibição de fosforilação; degradação mediada por ubiquitinação; e endocitose de receptores (Johnson e Ingram, 2005). De uma forma geral não existe um mecanismo único de regulação dos RLKs e sim mecanismos que diferem de um receptor para outro, uma vez que um único receptor pode atuar em diferentes vias de sinalização.

Proteína NIK1 (*NSP-Interacting Kinase*)

NIK1 (*NSP-Interacting Kinase*) é um receptor transmembrana do tipo serina/treonina cinase (RLK), que está classificado na subfamília LRR-II-RLK. A subfamília LRR-II possui 14 proteínas em *A. thaliana*, sendo caracterizadas por um domínio extracelular com cinco repetições ricas em leucina em um bloco contínuo, sendo quatro repetições ditas completas, com 24 resíduos de aminoácidos, e a quinta repetição incompleta apresentado 16 resíduos (Santos *et al.*, 2010).

A proteína NIK1 foi inicialmente identificada como um alvo de virulência da proteína NSP (*Nuclear Shuttle Protein*) codificada pelo genoma de *Begomovirus*, o maior gênero da família Geminiviridae (Fontes *et al.*, 2004). NIK1 foi isolada primeiramente em tomateiros, sendo designado *LeNIK* (*Lycopersicon esculentum NSP-Interacting Kinase*), (Mariano *et al.*, 2014). Posteriormente, foi também comprovado que homólogos de NIK1 em soja e em *A. thaliana* interagem com a proteína viral NSP

(Fontes *et al.*, 2004). Em *A. thaliana* a interação de NSP com NIK1, ocorre no seu domínio cinase citoplasmático, resultando na inibição da atividade de NIK1, e consequentemente, na resposta à infecção viral (Fontes *et al.*, 2004)

Estudos anteriores mostraram que a superexpressão de *AtNIK1* em folhas de tabaco infectadas com begomovírus diminuiu a inibição gerada por NSP na atividade de NIK1, superando assim, o efeito inibitório dessa proteína viral (Carvalho *et al.*, 2008). Além disso, a expressão aumentada de NIK1 em tomateiros atenuou os sintomas associados à infecção por begomovírus (Zorzatto *et al.*, 2015). No entanto, a efetividade dessa via de sinalização mediada por NIK1 contra a infecção por geminivírus é restrita, já que NSP suprime a atividade de NIK1, e porque a ativação da via parece ser dependente do início da infecção (Carvalho *et al.*, 2008; Zorzatto *et al.*, 2015). Em diferentes grupos de plantas, NIK1 desencadeia uma resposta de defesa contra a infecção viral, uma vez que também foi comprovado que em mutantes com inativação dos genes da proteína NIK1 a suscetibilidade ao vírus é aumentada (Fontes *et al.*, 2004). Estes resultados de perda de função caracterizaram NIK1 como um receptor transmembrana capaz de atuar numa via de sinalização antiviral (Fontes *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010).

A interação de NSP com o domínio cinase de NIK1 inibe sua atividade de autofosforilação e fosforilação de componentes *downstream* da via. NIK1, por ser um receptor cinase transmembrana de passo único, deve dimerizar-se ou multimerizar com um co-receptor para promover a trans-autofosforilação, e, subsequente, ativação da cinase. Em mamíferos e em plantas, tem sido demonstrada a oligomerização de receptores cinases transmembrana de passo único que são induzidos ou estabilizados por ligantes como um evento inicial crítico que desencadeia a sinalização e transdução do receptor (Santos *et al.*, 2010).

A região no domínio cinase de NIK1 de *Arabidopsis* em que NSP se liga foi mapeada, e consiste em um fragmento formado por 80 resíduos de aminoácidos que abrange a alça de ativação (*A-loop*) e o sítio ativo da enzima (Fontes *et al.*, 2004). A fosforilação de resíduos presentes no *A-loop* constitui um mecanismo regulatório importante para a atividade de tirosina e serina/treonina cinases (Nolen *et al.*, 2004). Por meio de experimentos de alinhamento de sequências foi observado que a treonina 474 (T474) do *A-loop* de NIK1 está alinhada com o resíduo de treonina 468 da proteína SERK1, cuja fosforilação é essencial para ativação dessa cinase (Santos *et al.*, 2009). Assim, também foi demonstrado em ensaios de fosforilação *in vitro* que o resíduo T474

é essencial para atividade de NIK1 (Santos *et al.*, 2009). A ativação de NIK1 promove a fosforilação do componente *downstream* da via de sinalização antiviral, promovendo a translocação da proteína ribossomal RPL10 para o núcleo (Carvalho *et al.*, 2008). Mutações do resíduo T474 para alanina impacta negativamente a atividade de cinase de NIK1, sua capacidade de relocar RPL10 para o núcleo e sua atividade antiviral (Santos *et al.*, 2009).

Baseado nesta descoberta, foi construído um mutante de *AtNIK1* (T474D), cuja treonina 474 foi substituída por um resíduo de ácido aspártico, introduzindo assim uma carga negativa permanente, de forma a mimetizar a carga negativa do fosfato adicional da enzima em seu estado ativado. Esse mutante T474D apresentou uma hiperatividade de cinase quando comparado à atividade normal de NIK1, e uma capacidade aumentada de relocar RPL10 para o núcleo. Além disso, a mutação diminuiu o efeito inibitório imposto por NSP na atividade de trans-autofosforilação de NIK1 (Santos *et al.*, 2009) e conferiu tolerância a begomovírus em tomateiros transgênicos (Brustolini *et al.*, 2015).

O modelo da atual via de sinalização antiviral mediada pela proteína NIK1 preconiza que em resposta a estímulos não identificados induzidos pela infecção viral, o domínio extracelular LRR de um receptor NIK1 sofre oligomerização com outro receptor, permitindo a aproximação dos respectivos domínios cinases, e, conseqüente, na trans-autofosforilação de domínios cinases intracelulares (Figura 1). A transfosforilação da T474 presente no *A-loop* ativa o receptor NIK1. Essa ativação é dependente de fosforilação, e após a adição de um fosfato no domínio citoplasmático de NIK1, inicia a amplificação da cascata de sinalização que promove a translocação da proteína ribossomal RPL10A para o núcleo da célula, onde interage com a proteína LIMYB (*L10-interacting Myb domain-containing protein*) para reprimir a expressão de genes da maquinaria de tradução da célula do hospedeiro (Machado *et al.*, 2015). A repressão da expressão desses genes envolvidos na tradução causa uma supressão na síntese global de proteínas como mecanismo de imunidade antiviral, já que os mRNAs virais não são capazes de ser traduzidos eficientemente frente a ativação do receptor NIK1, representando um mecanismo eficaz contra a infecção viral.

Apesar desses recentes progressos para o entendimento do mecanismo da via de sinalização antiviral mediada por NIK1, muitos aspectos permanecem obscuros. Por exemplo, ainda são desconhecidos os ligantes ou as bases moleculares que desencadeiam ou estabilizam a dimerização de NIK1 com um co-receptor, promovendo a trans-autofosforilação. Assim também, não se sabe se a ativação da defesa antiviral é

mediada por autodimerização de NIK1 ou por oligomerização com co-receptores e, sendo neste caso, qual a identidade dos co-receptores. Além disso, ainda não foram identificados os intermediários da via de defesa que promovem a fosforilação de RPL10 em resposta à ativação de NIK1. Também não se sabe se a supressão de tradução global mediada por NIK1 é simplesmente devido à repressão de expressão de genes envolvidos na tradução ou se a translocação de RPL10 para o núcleo, por si só, promove desestabilização dos ribossomos, e, como consequência, interfere com a tradução global das células hospedeiras.

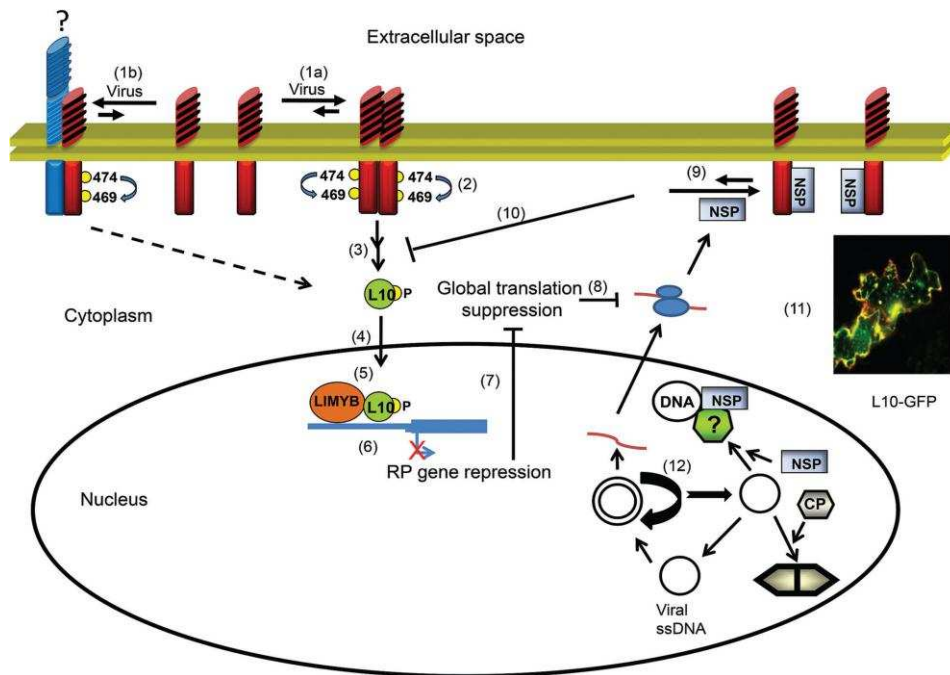


Figura 1 Modelo do mecanismo para a via de sinalização antiviral mediada por NIK1. A oligomerização do domínio extracelular de NIK1 (1a) induzida por infecção viral aproxima os domínios cinases intracelulares no citoplasma da célula, permitindo a transfosforilação no resíduo chave de treonina na posição 474 (Thr-474) para ativação da cinase (2). Alternativamente, NIK1 interage com um ligante LRR-RLK desconhecido de um modo dependente de estímulo (1b). Embora a infecção viral desencadeie uma via de resposta mediada por NIK1, a base molecular de tal eliciação é desconhecida. A ativação de NIK1 intermedeia indiretamente a fosforilação RPL10 (3) promovendo a sua translocação para o núcleo (4), onde interage com LIMYB (5) para regular a expressão de genes relacionados com a maquinaria traducional (6). Portanto, a propagação do sinal antiviral culmina com supressão da síntese global de proteínas (7), que também prejudica a tradução do mRNA viral (8). Por outro lado, a ligação de NSP de begomovírus ao domínio cinase (*A-loop*) de NIK1 inibe a autofosforilação na Thr-

474 (9), impedindo, assim, a ativação do receptor cinase e a fosforilação RPL10 (10). Como consequência, RPL10 é presa no citoplasma de células infectadas, criando um ambiente intracelular que é mais favorável para infecção promovida por begomovírus. O DNA de cadeia simples viral replica por meio de intermediários de DNA de cadeia dupla (12) que são transcritos no núcleo da vegetal célula vegetal infectada. NSP liga-se ao DNA viral nascente e facilita o seu movimento para o citoplasma em um processo que pode ser mediada por uma proteína exportina-like ainda não identificada

Além da participação de NIK1 na resposta imune contra vírus Machado et al. (2015) apresenta indícios da participação desta proteína em outras vias de sinalização na célula vegetal, tais como em respostas à infecção bacteriana, ao ácido salicílico, além de sua participação na regulação negativa da resposta a BR, podendo estar diretamente relacionada com o desenvolvimento do vegetal, desenvolvimento de células estaminais, bem como a indução floral, desempenhando um papel oposto ao de BAK1 e BRI1 no processo de desenvolvimento do vegetal. Tais evidências estão embasadas na regulação positiva de genes de desenvolvimento em resposta a perda de função de *NIK1* no nocaute *nik1* (Machado et al., 2015). Porém, pouco ainda se sabe a respeito da participação de NIK1 nas vias de desenvolvimento do vegetal e parceiros de interação nesta via.

BAK1 (*Brassinosteroid Insensitive Associated Kinase 1*)

BAK1 (*Brassinosteroid Insensitive Associated Kinase 1*) foi identificada como uma proteína co-receptora da proteína de membrana BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive 1*); (Li et al., 2002; Nam e Li, 2002), o receptor de BR (Li e Chory, 1997). Tanto BRI1 como BAK1 são proteínas receptoras cinases de membrana com repetições ricas em leucina (LRR-RLKs), que pertencem a uma família com pelo menos 216 membros em *A. thaliana* (Dievart e Clark, 2004). Além disso, BAK1, também conhecida como SERK3 (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 3*) e faz parte de uma sub-família constituída por cinco membros em *Arabidopsis*: SERK1 a SERK5 (Li et al., 2002; Nam e Li, 2002).

A função de BAK1 não está restrita ao desenvolvimento vegetal regulado por BR, pois esta proteína de membrana também é importante para defesa vegetal contra

patógenos. As plantas possuem mecanismos de defesa inatos para se protegerem dos ataques por patógenos, tais como receptores de membrana responsáveis por perceberem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e ativarem respostas de defesa. Uma destas respostas é conhecida como defesa basal ou PTI, *PAMP-triggered immunity* (Schwessinger e Zipfel, 2008). Um dos receptores de membrana que reconhecem PAMP é o FLS2 (*Flagellin-Sensing2*), responsável por perceber o peptídeo bacteriano de 22 aminoácidos derivado da flagelina (flg22) e iniciar uma cascata de fosforilação que irá culminar em respostas de defesa (Gomez-Gomez e Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2004). Sabe-se que BAK1 é co-receptor de FLS2: na presença de flg22, FLS2 se liga a BAK1 e ambos são fosforilados (Chinchilla *et al.*, 2007). Outro receptor conhecido é o EFR (*Elongation Factor Tu Receptor*), que percebe o fator de alongamento bacteriano EF-TU e também interage com BAK1, permitindo que BAK1 funcione como um co-receptor (Chinchilla *et al.*, 2007; Schulze *et al.*, 2010). Além de BAK atuar em vias de defesa contra patógenos bacterianos, outros estudos descrevem a importância desta proteína na defesa contra fungos patogênicos e oomicetos, onde foi demonstrado que fungos patogênicos se proliferam melhor em plantas de *Arabidopsis* e *Nicotiana benthamiana* mutantes com perda de função de *BAK1* (Jordá *et al.*, 2015; Heese *et al.*, 2007).

Além disso, BAK1 também é importante para defesa vegetal contra a herbivoria em *Arabidopsis*. Os vegetais também possuem receptores de membrana responsáveis por perceberem padrões moleculares associados a herbívoros (HAMP) e ativarem respostas de defesa. Exemplos disso são as proteínas de membrana específicas de *A. thaliana* PEP1 RECEPTOR1 e 2 (PEPR1 e PEPR2), que reconhecem o peptídeo elicitador endógeno AtPep1, o qual é induzido por ferimentos na planta causados pelos herbívoros (Yamaguchi *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2010). BAK1 se associa com as proteínas de membrana PEPR1/2 quando o peptídeo AtPep1 está presente, participando assim deste mecanismo de defesa (Postel *et al.*, 2010). E ainda recentemente, foi descoberto a participação de BAK1 na via de controle de morte celular (Halter *et al.*, 2014) e também sua participação na regulação de desenvolvimento dos estômatos (Meng *et al.*, 2015).

Desta forma, BAK1 não regula apenas respostas de desenvolvimento de plantas dependentes de BRs, mas também modula vias envolvidas com respostas de defesa ao ataque de patógenos, herbivoria, participa no controle da morte celular e desenvolvimento estomático, mostrando-se uma cinase muito versátil quanto a processos de sinalização.

BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive 1*)

Brassinosteróides (BRs) são percebidos por uma proteína cinase (RLK) localizada na membrana plasmática, caracterizada por possuir repetições ricas em leucina (LRR), chamada de BRI1 (*Brassinosteroid-insensitive 1*). BRI1 foi isolada e clonada, após a identificação de um grande número de alelos mutantes recessivos num único *locus*, que eram de vários escrutínios intensivos para mutantes insensíveis a BRs na inibição do crescimento da raiz (Clouse *et al.*, 1996) ou no hipocótilo (Li e Chory, 1997). Em geral, a proteína BRI1 possui três domínios principais com função única receptora de ativação na presença de BR. Possui um grande domínio de ativação extracelular, um domínio transmembrana, e um domínio cinase intracelular. O domínio extracelular de BRI1 contém, na extremidade (N)-terminal, um peptídeo sinal, um motivo zíper de leucina, 24 LRRs, e um domínio de ilha localizado entre as LRRs 20 e 21 (Li e Chory, 1997). O peptídeo sinal e o motivo zíper de leucina são importantes para a orientação de BRI1 na membrana plasmática e dimerização, podendo ser a região de interação proteína-proteína com outras LRRs que participam da via de resposta a BR (Li e Chory, 1997; Wang *et al.*, 2001). O domínio intracelular pode ser ainda mais dividido, o qual consiste numa área pequena da região justamembrana intracelular (JM), um domínio catalítico de cinase, e uma cauda C-terminal. Embora a ausência da porção JM não interfira na localização celular e atividade de autofosforilação *in vitro* de BRI1 (Wang *et al.*, 2005), o domínio JM é necessário para transdução de sinal a partir do exterior para o interior de uma célula. De fato a superexpressão de uma proteína mutante de BRI1 com a ausência da região JM não foi capaz de reverter o fenótipo anão de *bri1-5*, um mutante insensível à percepção de BRs. Mutações pontuais no domínio cinase de BRI1 resulta em um receptor inativo, indicando o papel essencial deste domínio na atividade basal de BRI1 (Friedrichsen *et al.*, 2000). Estudos recentes identificaram vários sítios de fosforilação Ser/Thr dentro do domínio catalítico de BRI1, os quais são essenciais para a sinalização a BR, que incluem T1049, S1044 e T1045. A cauda C-terminal de BRI1 aparentemente desempenha um papel negativo na regulação da resposta basal de BRI1, uma vez que uma mutação em BRI1 na sua região C-terminal intensificou a atividade de autofosforilação e de atividade cinase de BRI1, *in vitro* (Wang *et al.*, 2005).

Considerando que BRI1 pode formar homodímeros na ausência e na presença de BRs, Wang *et al.* (2005) propuseram um mecanismo de auto regulação na ativação de

BRI1, ou seja, sem BRs, homodímeros de BRI1 mantêm-se em estado de repouso por sua cauda C-terminal. A ligação de BR induz a alteração conformacional do seu domínio cinase, e, subsequentemente, auto fosforilação de vários resíduos de Ser/Thr na cauda C-terminal para libertar a sua auto inibição. Além disso, um regulador negativo específico, BKI1, também é necessário para manter BRI1 em baixa atividade basal, impedindo a interação de BRI1 com outros reguladores positivos (Wang e Chory de 2006).

No complexo receptor de BR, além BRI1, o co-receptor BAK1, também é necessário para ativação desta cinase. BAK1 foi identificado por meio de experimentos de duplo híbrido em levedura para proteínas que interagem com BRI1 (Nam e Li, 2002). Estudos independentes demonstraram que BRI1 e BAK1 podem interagir uns com os outros *in vitro* e *in vivo*, por meio dos seus domínio cinase. No entanto, BRs não podem se ligar diretamente a BAK1, sugerindo que BAK1 age na via de resposta após a ativação inicial de BRI1 (Wang *et al.*, 2005). A fosforilação de regiões específicas do domínio citoplasmático de BAK1 durante a formação do complexo sinalizador entre BRI1, BAK1 e BL é de fundamental importância para a transdução do sinal do meio extracelular para o meio intracelular (Macho *et al.*, 2015). Com base nesta informação Wang *et al.* (2008) propuseram que a transfosforilação entre BRI1 e BAK1 aumenta muito a atividade cinase de BRI1, sendo que a interação entre BRI1 e BAK1 não é dependente de fosforilação.

Após a percepção de BR pelo domínio extracelular de BRI1, o domínio de cinase de BRI1 primeiro fosforila e ativa parcialmente BAK1. Em seguida, por sua vez BAK1 transforforila BRI1 para melhorar ainda mais sua atividade cinase (Wang *et al.*, 2008). Antes da ligação de BR, BRI1 é mantido inativo por auto inibição da sua região C-terminal, e por um regulador negativo BKI1. Após a percepção de BR, ocorre uma alteração conformacional do domínio intracelular de BRI1 que promove auto-fosforilação da cauda C-terminal, além da fosforilação de BKI1, aliviando, deste modo, a sua inibição da atividade sinalizadora de BR (Lin *et al.*, 2013; Wang e Chory, 2006). O BRI1 pré-ativado recruta BAK1 à sua proximidade para aumentar a atividade de cinase um do outro por meio de transfosforilação, e para formar um complexo receptor totalmente ativado.

De uma forma geral, cinases receptoras dos vegetais são geralmente consideradas como cinases do tipo Ser/Thr, assim é BRI1. Estudos *in vitro* de ensaios de atividade cinase e análise fenotípica do mutante *bri1-5* com diferentes formas de

BRI1 mutados, mostraram que potenciais locais de fosforilação na região intracelular JM, alça de ativação, e cauda C-terminal são funcionalmente relevantes para elucidação da resposta a BR em plantas. A mutação de quatro de sete locais de autofosforilação: S838, T842, T846 e S858 para Aspartato (Asp; aminoácido que mimetiza a carga negativa de um fosfato) pode aumentar a atividade cinase de BRI1 (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). No entanto, mutações em S1044 / T1045, T1049 abole totalmente a atividade cinase BRI1 mutado, e o BRI1 mutado não pode resgatar o fenótipo anão de *bri1-5*. Substituições de S1162, S1166, S1168 e T1180 para o Asp na porção C-terminal de BRI1 pode melhorar significativamente a atividade cinase. Portanto, foi proposto que a fosforilação de diversos resíduos na porção C-terminal pode libertar a auto inibição imposta por esta região de BRI1 (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Além desses resíduos supracitados, a S891, presente no *A-loop* da proteína é parcialmente requerida para a transdução do sinal, uma vez que plantas *bri1-5* expressando uma proteína com mutação neste resíduo apresentaram o fenótipo de sinalização a BR apenas parcialmente resgatado, apoiando a ideia de que a mutação S891T não é funcionalmente equivalente à proteína de tipo selvagem BRI1 (Oh *et al.*, 2015). Pelo menos, sete LRR-RLKs, incluindo BRI1 e BAK1, podem auto fosforilar determinados resíduos de tirosina. A análise de mutações específicas em BRI1 feitas *in vitro* e *in vivo* identificou dois resíduos de tirosina (Y1052 e Y831) importantes para a sinalização a BR, sugerindo que, como nos sistemas de mamíferos, a fosforilação de tirosinas do receptor também pode ser um mecanismo importante na regulação da atividade de receptores cinase em plantas (Oh *et al.*, 2015).

Em síntese, muitas proteínas além de BRI1 e BAK1 participam na regulação da via de resposta a BR, seja positivamente ou negativamente, e acredita-se que ainda exista muito a ser descoberto com relação à regulação desta via (Figura 2). Dentre as proteínas conhecidas que participam positivamente da regulação desta via pode-se citar a proteína fosfatase BSU1 (*Bri1-Suppressor1*); (Mora-Garcia *et al.*, 2004). A BSU1 desfosforila, e, conseqüentemente, inativa a proteína BIN2 (*BR Insensitive2*), que regula negativamente a via. A proteína BAK7/SERK4, também localizada na membrana plasmática, pode atuar de maneira redundante a BAK1 (Jeong *et al.*, 2010). Esta pode formar um complexo com BRI1 e BL, sendo que o hormônio esteróide age estabilizando a interação entre BRI1 e SERK4 (Santiago *et al.*, 2013; Karlova *et al.*, 2006). Duas outras proteínas de membrana podem regular negativamente a via de BR por interagirem com BRI1, são elas a TTL e BSK1, uma vez que foi demonstrado que

plantas mutantes nesses genes são maiores, enquanto que plantas superexpressando são semi-anãs; demonstrando o papel inibitório destes genes na via de BR. Sendo que diferentemente de BSK1 TTL interage fortemente com o domínio cinase ativo de BRI1, mais que o inativo, sugerindo que TTL pode inibir a sinalização de BRI1 após sua ativação (Wang e Chory, 2006).

Embora todos os receptores da sub-família LRRII-RLK, pertencentes ao sub-grupo SERKs, participam positivamente da via de sinalização de BRs por meio de interações com o receptor BRI1, o transcriptoma induzido por perda de função de NIK1, também pertencente à sub-família LRRII-RLK, sugere que NIK1 possa exercer uma regulação negativa na referida via. Esta possível modulação inversa de NIK1 em eventos de desenvolvimento ainda não foi cientificamente examinada e constitui o objetivo primordial dessa investigação.

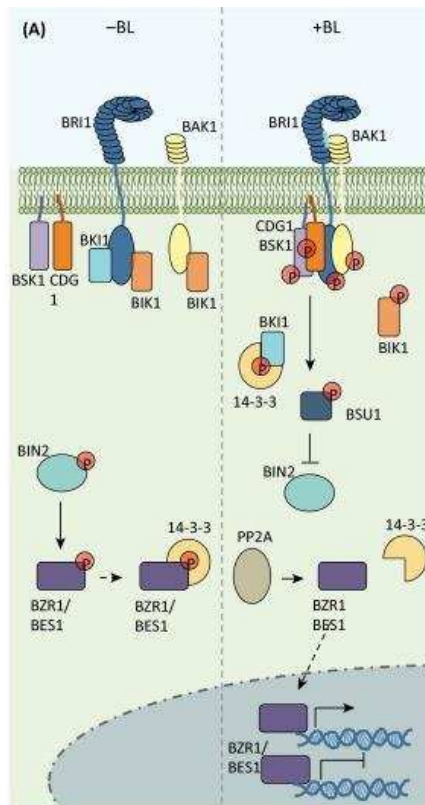


Figura 2 Via de sinalização mediada pelo receptor de membrana BRI1 em Arabidopsis. Após a ligação de BR, ocorre a heterodimerização de BRI1 com o seu co-receptor BAK1 a dissociação do inibidor BKI1, conduzindo a transfosforilação de seu próprio domínio cinase e de seu co-receptor. BKI1 atua como regulador negativo de BRI1. Quando o complexo BRI1/BAK1/BR está ativado BRI1 fosforila e libera BKI1, o qual anteriormente permanecia ligado ao seu domínio citosólico. Além disso, BRI1 fosforila BSK1, que, em seguida, liga e fosforila BSU1 fosfatase, tornando-a ativa. BSU1 desfosforila e inativa a cinase BIN2; BIN2 inativo é degradado pela maquinaria do proteossomo. Na ausência de BR, ou quando a concentração do hormônio está baixa, BIN2 ativo, fosforila os dois principais fatores de transcrição que medeiam alterações da transcrição induzida por BR, BZR1 e BES1. BZR1 e BES1 fosforilados não se ligam ao DNA e são retidos no citoplasma pela proteína 14-3-3. Seguindo a percepção do BR, BZR1 e BES1 são desfosforilados por PP2A e liberados das proteínas 14-3-3, movendo-se para o núcleo para moldar a transcrição de genes induzidos por BR. BKI1 atua como um regulador positivo neste nível, ligando às proteínas 14-3-3 do citosol, promovendo o aumento da acumulação nuclear de BZR1 e BES1. Modelo mecânico descrito em Lozano-Durán e Zipfel, 2015.

MATERIAI E MÉTODOS

Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial de *E. coli*, colônias isoladas crescidas em placas com LB sólido/seletivo foram inoculadas em 5 ml de LB líquido seletivo e incubadas a 37° C por 12 h, com rotação constante a 180 rpm. Após crescimento, as células foram centrifugadas a 5000 x g por 3 min, e ressuspensas em 200 µL de Tris HCl 150 mM, pH 8, contendo EDTA 10 mM, e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão de lise NaOH, 200 mM SDS 1% (p/v), e a mistura foi incubada por 5 min em gelo, seguido da adição de 200 µL da solução de neutralização, acetato de potássio 3M, pH 5,5 ajustado com ácido acético e incubada novamente por 5 min em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 16000 x g por 10 min para remoção de restos celulares. Após a centrifugação, aproximadamente 500 µL do sobrenadante foram transferidos para microtubo, adicionados 600 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1, respectivamente. Após agitação rápida em vórtex por 30 segundos, a mistura foi centrifugada por 2 min a 16000 x g. O sobrenadante foi re-extraído com clorofórmio, e o DNA plasmidial precipitado com etanol 100%, lavado com etanol 70% e resuspenso em água milli-q autoclavada contendo RNase a 1 mg/ml e incubado por 15 min a 37° C. Para avaliar a integridade do DNA extraído, 3 µL da amostra foram corridos em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹.

Clonagem de proteínas quiméricas

O isolamento e clonagem do CDS de NIK1 (U19571), utilizado nos experimentos está descrito em Fontes et al., (2004). Para expressão das demais proteínas quiméricas, as quais também foram construídas e clonadas previamente pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, foram utilizados cDNAs obtidos a partir dos RNAs extraídos de *A. thaliana*.

Para amplificação do cDNA de BAK1, foi realizada uma reação de PCR com os iniciadores para o gene de BAK1 (BAK1-FW e AtBAK1-Rv) descritos na Tabela 1, ambos contendo adaptadores nas extremidades para o Sistema Gateway. Iniciadores específicos de actina (*AtACTIN-Fwd* e *AtACTIN-Rv*) foram utilizados para avaliar a

quantidade e a qualidade do cDNA. A reação de amplificação (PCR) foi composta de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, e 2 min a 72 °C. Um amplicom de aproximadamente 2000 pb foi obtido e purificado a partir de gel de agarose 1% (p/v), e clonado no vector pDONR201 usando BP clonase (Invitrogen). Para a reação de BP, foram utilizando 50 fmols do vector de entrada e a mesma concentração do inserto, além de 1 µL da enzima BP clonase, para o volume final de 5 µl. A reação ocorreu a 25 °C por 12 h, e foi interrompida adicionando-se 1 µl de proteinase K (Invitrogen) por 15 min a 36 °C. O clone resultante foi denominado pUFV1593.

Após clonagem em pDONR201, a CDS de BAK1 foi transferida de pUFV1593 para o vector binário pK7FWG2 por reação de LR clonase (Sistema Gateway, Invitrogen). Para a reação de recombinação, foram utilizados 150 ng do vector de destino vazio e igual quantidade do vector de entrada pDON-BAK1, juntamente com 1 µl de enzima LR Clonase (Invitrogen). A reação ocorreu por 12 h a 25° C sendo interrompida pela adição de 1 µl de proteinase K (Invitrogen) por 15 min a 37° C. O clone resultante, denominado pUF1619 (pBAK1-GFP), contém o CDS de BAK1 fusionado ao aminoterminal do CDS de GFP, sob o controle do promotor 35S.

A construção da proteína quimérica NIK1-BAK1 figura 3A, consistiu, inicialmente, na inserção de sítios para as enzimas de restrição *BamH* I e *Nsi* I, flanqueando o domínio cinase de BAK1, por meio da amplificação, utilizando o clone pUFV1593 como molde e os oligonucleotídeos iniciadores BAK1*BamHI*-FWD e BAK1*NsiI*pDONR201-Rv, contendo os respectivos sítios de restrição nas extremidades (Tabela 1). O clone pUFV1765 utilizado na construção desta proteína quimérica contendo o CDS de NIK1 em pDONR/207 foi previamente descrito, Fontes et al., (2014). O fragmento de DNA que codifica o domínio cinase de NIK1 e uma parte do segmento transmembrana foi liberado de pUFV1765 por digestão com as enzimas *BamH* I e *Nsi* I. O plasmídeo digerido foi separado por corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, e posteriormente purificado. Em seguida parte do fragmento transmembrana seguido do domínio cinase de BAK1 foi ligado linearmente no vector purificado contendo o domínio LRR de NIK1, formando o CDS quimérico de NIK1-BAK1 em Pdon/207. O produto de PCR, denominado KD-BAK1 foi amplificado e digerido com *Nsi* I e *BamH* I a partir de pUFV1593, purificado do gel e ligado linearmente em pUFV1765 (pDONR-NIK1), cujo domínio intracelular de NIK1 e uma parte do sítio transmembrana haviam sido previamente removidos por digestão com *Nsi* I e *BamH* I e recircularizados. O clone resultante foi denominado pUFV1868.

Para construção da proteína quimérica BAK1-NIK1, figura 3B, foi amplificado a partir da sequência de pDONR-BAK1 (pUFV1593), o fragmento que codifica o domínio LRR de BAK1, utilizando oligonucleotídeos, que possuíam em suas extremidades sítios para *Apa* I (*Apa*IDONR201-Fwd) e *Bam*HI (BAK1 BamH I-Rv), conforme descritos na Tabela 1. O produto de PCR foi hidrolisado com *Apa* I, purificado e inserido linearmente no lugar do domínio extracelular de NIK1, previamente digerido com *Apa* I e *Bam*H I de pUFV1765 para remoção do domínio extracelular e parte do domínio transmembrana de NIK, obtendo-se o clone pUFV1787.

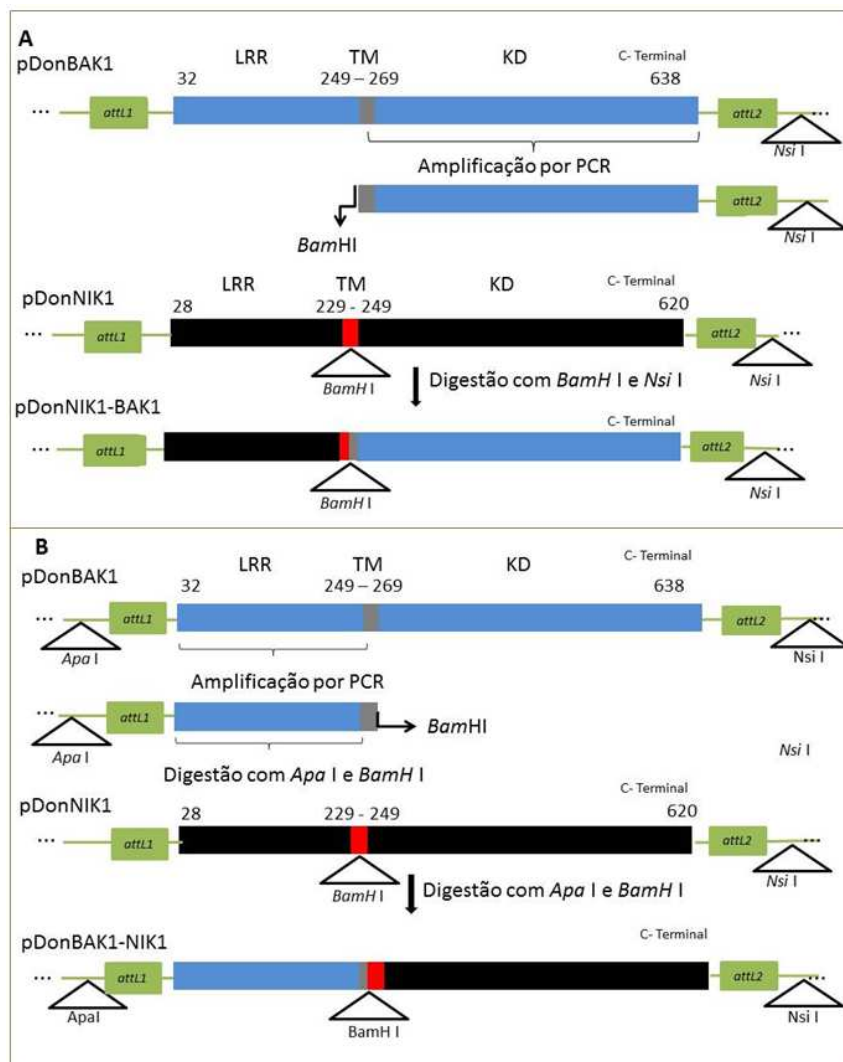


Figura 3 Representação esquemática das proteínas quiméricas pDonBAK1-NIK1 (**3A**), e pDonNIK1-BAK1 (**3B**). A numeração no topo da figura representa o esquema numérico para posição de aminoácidos. A relativa posição de sítios de restrição usados na construção das proteínas quiméricas é indicada na figura.

Os segmentos quiméricos denominados BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 foram transferidos por recombinação para o vetor binário de expressão em plantas, pK7FWG2, gerando os clones pUFV1868 (pNIK1-BAK1-GFP) pUFV1867 (pBAK1-NIK1-GFP) e, respectivamente. Nestes clones, os fragmentos quiméricos estão fusionados ao aminoterminal de GFP, sob o controle do promotor 35S, assim como mostrado na figura 3A e 3B.

Tabela 1 Oligonucleotídeos utilizados clonagem das proteínas quiméricas.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5' - 3'	Nome do gene
BAK1-Fwd	5'-AAAAGCAGGCTTCACAATGGAACGAAGATTAAT-3'	<i>AtBAK1</i>
BAK1- Rvs	5'-AGAAAGCTGGGTCTTCTTTGGACCCGAGGGGTAT-3'	<i>AtBAK1</i>
BAK1 <i>BamH</i> I-Fwd	5'- AAAAGGATCCGCGGGAGGAGTTGCTGCAGGT-3'	<i>AtBAK1</i>
<i>Nsi</i> IDONR201 –Rvs	5'- AAAATGCATCATCAGGAGTACGG-3'	-
<i>Apa</i> IDONR201-Fwd	5'- AAAAGGGCCCCAAATAATGATTTAT-3'	-
BAK1 <i>BamH</i> I-Fwd	5'-AAAAGGATCCTCCAGTAATTCTATTACTCCCT-3'	<i>AtBAK1</i>
Act3-Fwd	5'-ATGTCGTGAGCCATCCTGTC-3	Actina
Act3-Rvs	5'-ACACCGGATTCGTGCGGCAT-3'	Actina
GFP-Rvs	5'- CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC-3'	<i>GFP</i>

Material vegetal, condições de crescimento e obtenção de plantas transgênicas.

Mutantes alelos nulos em *A. thaliana nik1* (SALK_060808) (Fontes *et al.*, 2004), *bak1* (SALK_034523); (Li, *et al.*, 2002) foram utilizados para a transformação com NIK1 e BAK1 e as proteínas quiméricas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 para ensaios de complementação. Após a desinfestação, as sementes foram plaqueadas em placas de petri contendo meio MS 1/2 força (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose. As plântulas foram cultivadas a 20 °C por aproximadamente 2 semanas sob luz branca e, em seguida, transferidas para o solo sob regime de luminosidade 12h luz / 12h

escuro. A linhagem nocaute *nik1* foi transformada com as construções descritas acima: pUFV1867 (pBAK1-NIK1-GFP), pUFV1868 (pNIK1-BAK1-GFP), pUFV1619 (pBAK1-GFP) e pNIK1-GFP, como anteriormente descrito por Fontes et al. (2004).

Agrobacterium tumefaciens estirpe GV 3101 foi eletroporada com as construções gênicas descritas acima e colônias transformantes foram selecionadas em placa de petri em meio LB sólido suplementado com espectinomicina a 100 mg/l, antibiótico para seleção do vetor pK7FWG2 e com gentamicina a 50 mg/l, antibiótico para seleção da estirpe de Agrobactéria GV3101. A transformação das plantas foi feita utilizando o método de mergulhia floral, descrito em Bent (2006).

A incorporação da transgenia foi monitorada por PCR utilizando iniciadores específicos para o domínio cinase de NIK1, BAK1 e para a calda GFP (Tabela 1). A expressão do transgene foi confirmada por RT-PCR com os mesmos iniciadores. Como controle, foi amplificado o gene da actina, visando avaliar a quantidade e a qualidade do cDNA.

Ensaio de crescimento de hipocótilo

Neste ensaio, foram utilizadas sementes de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), linhagens *nik1* alelos nulos obtida por mutagênese insercional por T-DNA (*knock down* Salk_060808; Fontes et al., 2004), e *bak1-4* também obtido por mutagênese insercional (*knock down, bak1-4*, Salk_034523); (Li et al., 2002), e ainda plantas expressando as construções quiméricas BAK1-NIK1 (linhagem T2 6-1) e NIK1-BAK1 (linhagem T1 7-1).

As sementes foram desinfestadas com solução contendo etanol 75% (V/V) e hipoclorito de sódio 10% (V/V), durante 15 minutos, e posteriormente lavadas duas vezes com etanol 100%. Após a desinfestação, as sementes foram plaqueadas em placas de petri contendo meio MS 1/2 força (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 1% de sacarose. No caso das linhagens transformadas com as construções quiméricas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1, denominadas T2 6-1 e T2 7-1, respectivamente, foi suplementado com canamicina a 100 mg/L⁻¹. Em todas as placas, o efeito da ativação da via de sinalização por BR, foi avaliado com a adição de brassinosteróide sintético (brassinolídeo, BL) na concentração de 2 µM.

As placas contendo as sementes foram armazenadas a 4 °C por 96 h para quebra de dormência, e, posteriormente, expostas à luz por uma hora em câmara de crescimento a 22 °C. Após este período de exposição, as placas foram envoltas em folhas de papel alumínio para proporcionar a condição de ausência de luz. Para os grupos controle, as placas ficaram expostas a um fotoperíodo de 16 horas luz / 8 horas escuro a, 22 °C.

As medições do comprimento do hipocótilo e da raiz foram feitos com o uso de paquímetro analógico 6'' Zaas Precicion, com três, sete e quatorze dias após a transferência para a câmara de crescimento. Para todas as linhagens transformadas e controles, foram medidos a raiz e o hipocótilo de três plantas.

Extração de RNA e preparo de cDNA

Para isolamento de RNA total, plantas de *A. thaliana*, crescidas em placa de petri em meio MS ½ força com 8 dias de idade, foram transferidas para placa contendo meio MS puro como grupo controle ou suplementado com o brassinosteróide sintético brassinolídeo (BL), na concentração de 2 µM, por dois dias. Após este período, as plantas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C. Para a extração do RNA total, foi utilizado aproximadamente 100 mg de tecido vegetal macerados em cadinho com nitrogênio líquido e homogeneizados com TRIZOL (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

Após a extração, o *pellet* de RNA foi seco em temperatura ambiente por 15 a 20 minutos e ressuspensos em 40 µL de água DEPEC (dietilpirocarbonato), após a extração 4000 µg de RNA foram tratados com 1 mg/ml de DNase I (Invitrogen), por 15 minutos a temperatura ambiente, após este período, a enzima foi inativada pela adição de 1 µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a 25 mM, seguido por incubação a 65 °C por 10 minutos. O RNA tratado foi acondicionadas em freezer a -80°C. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão NBC (NaOH 5 mM, Ácido Bórico 50 mM, Citrato de Sódio 1 mM) corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL⁻¹.

Para preparo do cDNA, o RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro Bio Spec-Nano Shimadzu Biotech, a 260 nm, e sua concentração expressa em ng/µl. Aproximadamente 4 µg do RNA total foram utilizados como molde, juntamente com 4 µM do oligonucleotídeos oligo dT, 1 µl de dNTPs 10 mM, 4 µl do

tampão da enzima transcriptase reversa (Invitrogen: Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 8.3, KCl 3 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 75 mol.L⁻¹) e 1 U de M-MLV RT Transcriptase Reversa em um volume final de 19 µl, de acordo com as recomendações do fabricante.

Análises de qRT-PCR

Para análise de expressão gênica por qRT-PCR (PCR em tempo real) foi utilizadas duas linhagens independentes de plantas *nik* complementadas com NIK1 (NIK1-5 e NIK1-8) e três linhagens independentes complementadas com as quimeras BAK1-NIK1 (T2 6-1, T2 6-2) e NIK1-BAK1 (T2 7-1, T2 8-1). O acúmulo de transcrito de genes envolvidos na via de resposta a BR foi detectada por qRT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 2). As reações de qRT-PCR foram realizadas em ABI7500 (Applied Biosystems) usando 500 fmols dos oligonucleotídeos com *SYBR Green* PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O gene de actina foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. O método 2^{-ΔΔCT} foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados em reação de qRT-PCR, para genes envolvidos na via de resposta a brassinosteróides.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5' - 3'	Nome do gene
Xtr6-483qRT-Fwd	5'-TACTCTATCCTCTGGAACCCACA-3'	<i>Xtr6</i>
Xtr6-580qRT-Rev	5'-CATTCTCATTGGCTGGTTCTTAG-3	<i>Xtr6</i>
AtIAA19-qRT-Fwd	5'-GGCGTTTATGGTAAAGGAGCTTA-3'	<i>IAA19</i>
AtIAA-qRT-Rev	5'-TAGGATCATACAAAGCAGGAAGC-3'	<i>IAA19</i>
Actina-Fwd	5'- ATGTCGTGAGCCATCCTGTC-3'	<i>Actina</i>
Actina-Rev	5'- ACACCGGATTTCGTGCGGCAT-3'	

Transformação de leveduras e teste de duplo híbrido

A transformação e crescimento da levedura *Sacharomyces cerevisiae* foram realizados conforme descrito por Gietz e Woods (2002). 10 µl de pré-inóculo de levedura cepa AH109 crescida em meio YPDA (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 1 mg/l adenina) foram diluídos em 5 mL de YPDA, e as leveduras foram crescidas por 24 h, a 180 rpm e 28 °C. No dia seguinte, 1,5 mL da cultura foi centrifugada por 2 minutos a 3000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de água miliq autoclavada. Após a lavagem com água, as células foram lavadas novamente com 1 ml de acetato de lítio a 100 mM e centrifugadas. Às células sedimentadas foram adicionados: 240 µl PEG 4000 50%, 36 µl LiAc 1 M, 80 µl de ssDNA de salmão 600 mg/µL e aproximadamente 1 mg de DNA plasmidial de interesse, diluído em 50 µL de água. Após 30 min de incubação em banho-maria a 30 °C e posteriormente incubação por 20 minutos a 42 °C, as células foram centrifugadas novamente, lavadas com 1 ml de água, ressuspensas em 100 µL de água miliq estéril. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio SD (6,5 mg/L nitrogênio base, 20 g/L de glicose, 10 ml de solução de aminoácidos totais depletada de triptofano ou leucina com ágar a 3% (p/v) e pH 5,8. A placa foi incubada a 28°C por 4 dias. As células de levedura transformadas com os vetores de interesse foram selecionadas em meio SD sem leucina, triptofano e histidina para testar as interações.

Para identificar a possível interação entre o domínio cinase de NIK1 e BRI1, foi utilizado o sistema de duplo híbrido em leveduras. Para realização deste ensaio, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da estirpe AH109 foram transformadas com o clone pUFV2759, esta construção permite a expressão do domínio cinase de BRI1 fusionado ao domínio de ligação (BD-*binding domain*) ao DNA do transfator GAL4, clonado por LR a partir de pUFV769 (Rocha 2007). Os transformantes foram selecionados na ausência do aminoácido leucina. Leveduras foram também transformadas com o clone pUFV2760 contendo o domínio cinase de BRI1 fusionado ao domínio de ativação (AD-*activation domain*) do transfator GAL4, obtido também por LR clonase a partir de pUFV769. Os transformantes foram selecionados na ausência do aminoácido triptofano. Posteriormente, os transformantes simples obtidos foram co-transformados com os clones pUF2836 contendo o domínio cinase de NIK1 fusionado ao BD do transfator GAL4, ou pUFV2837 construção contendo o domínio cinase de NIK1 fusionado ao AD do transfator GAL4, ambos clonados por LR a partir de pDON-KD-NIK1 (Fontes et al., 2004) ou pUFV1762 (pAD-BAK1; Sakamoto et al., 2012).

Para a reação de transferência, por LR clonasse, do domínio cinase de BRI1 para pDEST22 ou pDEST32, foram utilizados 150 ng do vetor de destino vazio e igual quantidade do vetor de entrada pDON-KD-BRI1, juntamente com 1 µl de enzima LR Clonase (Invitrogen). Os transformantes positivos foram selecionados em meio LB seletivo com ampicilina a 100 mg/l para o vetor pDEST 22, e gentamicina a 20 mg/l para o pDEST 32 e confirmados por meio de reação de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 3. Os clones resultantes foram denominados pUF2837 e pUFV2836, respectivamente. O mesmo foi feito para os domínios cinase de NIK1 E BAK1. O DNA plasmidial foi extraído pelo método lise alcalina e utilizados para a transformação das leveduras.

As proteínas com capacidade de interagir *in vivo* com BRI1 foram identificadas mediante seleção das colônias de levedura que apresentaram crescimento em meio SD/-Leu/-Trp/-His + 10mM 3AT (3-amino 1, 2, 4 triazol). As possíveis interações foram observadas após 4 dias de incubação a 28 °C.

Tabela 3 Oligonucleotídeos utilizados para confirmação das construções gênicas.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência 5'- 3'	Nome do gene
Kd-NIK-Fwd	5'- TTTGATCAAGTCTCA-3'	Domínio cinase de NIK1
Kd-BRI-Rvs	5'-AGAAAGCTGGGTCTCATAATTTTCCT -3'	Domínio cinase de BRI1
AtNIK1-Rvs	5'- CGCCCTTCGCCCTCGCCGGACAC-3'	NIK1
AtBAK-Rvs	5'AGAAAGCTGGGTCTTATCTTGGACCCGAGG GGTA-3'	BAK1
DEST 22-Fwd	5'-AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC-3'	-

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteínas quiméricas por troca dos domínios cinase e LRR entre BAK1 e NIK1 são corretamente expressas e localizadas na membrana plasmática em linhagens transgênicas.

BAK1 e NIK1 são proteínas de membrana com grande similaridade estrutural (Figura 4). Baseado em análise filogenéticas de domínio cinase e domínio extracelular, estas duas proteínas foram incluídas na subfamília II de LRR-RLKs, devido a presença de cinco repetições ricas em leucina (LRRs) em seus domínios extracelulares. Embora NIK1 e BAK1 sejam estruturalmente relacionadas (Figura 4), duas linhas de evidência indicam que estes receptores de membrana sejam funcionalmente divergentes. Primeiro, o mecanismo que fundamenta a via de defesa antiviral mediada por NIK1 é absolutamente divergente do mecanismo de imunidade engatilhada por PAMPs mediada pelo co-receptor BAK1 (Jordá *et al.*, 2016; Zorzatto *et al.*, 2015). Em segundo lugar, o transcriptoma induzido por inativação de NIK1 no mutante *nik1* parece estar em perfeito contraste com as respostas moleculares induzidas pela ativação de BAK1 (Machado *et al.*, 2015; Zorzatto *et al.*, 2015). Por meio de análise de RNA-seq, que permite avaliar diferencialmente a expressão gênica global, foi observado que no mutante de *nik1* genes relacionados com a resposta a BR são regulados positivamente (Machado *et al.*, 2015). Tais genes foram sub-categorizados como centros de controle na diferenciação celular, desenvolvimento da floração e desenvolvimento pós-embriônico. Com relação a genes envolvidos com mecanismos imunológicos dos vegetais, foi possível observar a expressão diferencial de genes induzidos que participam da resposta a ácido salicílico (SA) e sinalização em resposta a bactérias (Machado *et al.*, 2015). Estas observações sugerem que NIK1 possa atuar como um regulador negativo da resposta a BR, desempenhando um papel oposto ao de BAK1 na via de desenvolvimento mediada pelo receptor de BR, BRI1. Além disso, também sugerem que BAK1 e NIK1 desempenham um papel inverso na via de resposta a estresses bióticos e resposta a SA. Recentemente, nosso grupo de pesquisa confirmou que NIK1 funciona como modulador negativo na imunidade induzida por PAMPs (Elizabeth Fontes, comunicação pessoal)

domínio extracelular LRR, seguido de uma pequena região transmembrana de NIK1 e o domínio cinase de BAK1 no carboxi-terminal. Uma troca inversa desses domínios foi feita, gerando a proteína quimérica BAK1-NIK1 (Figura 5), onde o domínio extracelular LRR de BAK1 com uma pequena região transmembrana foi fusionado a uma pequena região transmebrana de NIK seguido de seu domínio cinase. Ambas as proteínas quiméricas foram fusionadas à proteína GFP.

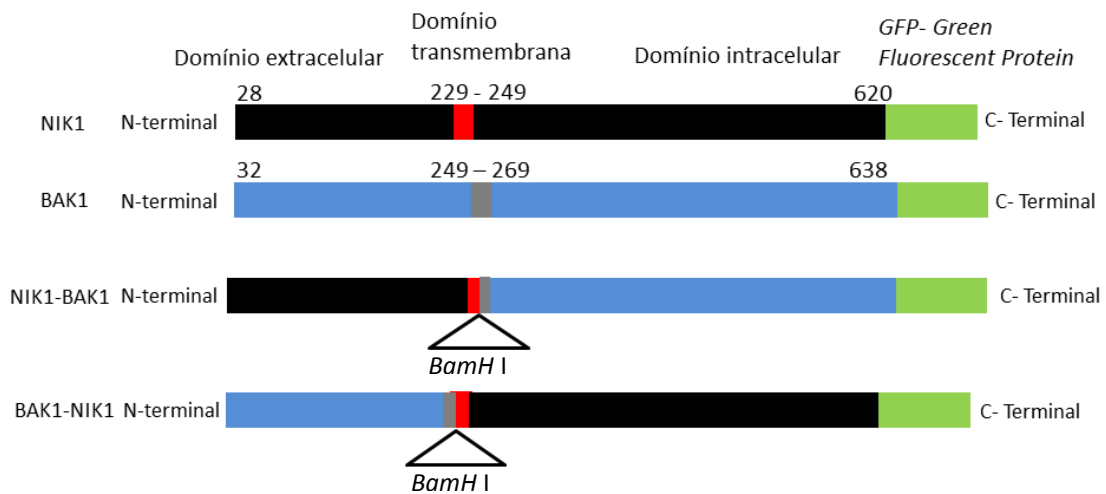


Figura 5 Representação esquemática das proteínas quiméricas NIK1-BAK1, BAK1-NIK1, clonadas a partir de NIK1 e BAK1.

As construções de DNA foram utilizadas para transformar linhagens de *A. thaliana* nocaute *nik1* alelos nulos, e a expressão dos genes quiméricos confirmada por RT-PCR e por microscopia confocal (Figura 6). A microscopia confocal confirmou uma concentração de fluorescência na membrana plasmática, indicando que as proteínas quiméricas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 foram corretamente localizadas nas células transfectadas.

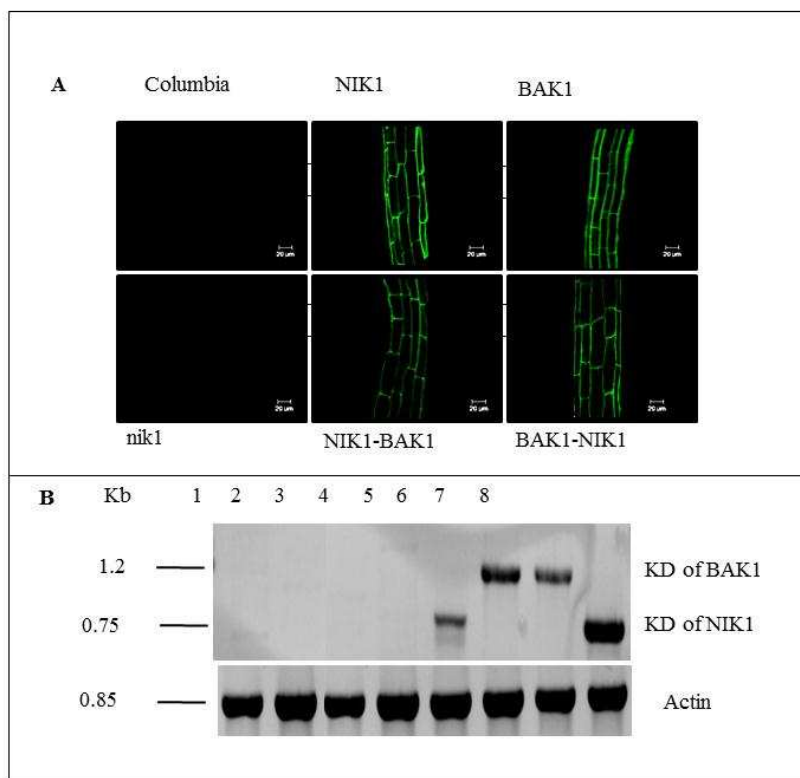


Figura 6 Expressão das proteínas quiméricas em *Arabidopsis thaliana*. **(6A)** Localização das proteínas quiméricas na membrana plasmática de raízes de *A. Thaliana*. A fluorescência de GFP foi detectada por microscopia de fluorescência confocal. **(6B)** RT-PCR foi feita com RNA extraído de Columbia (poços 1 e 2), *nik1* (poços 3 e 4), mutante *nik1* transformado com 35S:NIK1-GFP (poço 5), 35S-BAK1-GFP (poço 6) e proteínas quiméricas NIK1-BAK1 (poço 7) e BAK1-NIK1 (poço 8). Nos poços 1, 3, 5 e 8 foi utilizado o iniciador *foward* (FWD) para o domínio cinase de NIK1 e de BAK1 nos poços 2, 4, 6 e 7, o iniciador reverso (RV) para o gene da proteína GFP foi utilizado em todas as reações.

As proteínas quiméricas exibem transdominância negativa sob BAK1, indicando que domínios de NIK1 podem interferir negativamente com desenvolvimento

Plantas mutantes *bak1-4* apresentam fenótipo anão e crescimento da roseta reduzido quando cultivadas em dias curtos (8h luz/16h escuro), e redução do comprimento de hipocótilo de plântulas estioladas cultivadas em meio suplementado com BL na ausência de luz (Wang *et al.*, 2004). O comprimento da raiz e do hipocótilo de plantas estioladas é uma característica comum utilizada para avaliar o crescimento de

plantas, tanto quanto na resposta a BR (Wang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2016), quanto a outros reguladores de crescimento como giberelina (Claeys *et al.*, 2014) e auxina (Tatematsu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016). Desta forma, para avaliar o papel de NIK1 no desenvolvimento e também sua resposta em fotomorfogênese, os mutantes de *nik1* e as linhagens transgênicas expressando NIK1 ou as proteínas quiméricas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 no genótipo *nik1* foram crescidas em solo e meio MS puro e fenotipicamente avaliadas. Linhagens Col-0 e *bak1-4* foram incluídas no ensaio como controles positivo e negativo, respectivamente.

Consistente com seu papel como co-receptor na via de sinalização a BRs, o nocaute *bak1-4* apresentou um fenótipo de crescimento prejudicado, enquanto que o nocaute de *nik1* foi ligeiramente menor do que as linhagens controle Col-0 (Figura 7). Provavelmente, o ligeiro defeito no crescimento de *nik1* se deve à ativação constitutiva do sistema imune inato de plantas no mutante *nik1*, recentemente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisadores (Elizabeth Fontes, comunicação pessoal). Os fenótipos das plantas transformadas com os genes quiméricos foram então comparados com o ecotipo Columbia e com *nik1*, *bak1-4* e *nik1* complementada com 35S:NIK1-GFP. A expressão de NIK1 em *nik1* reverte o fenótipo do mutante e as linhagens complementadas possuem o crescimento comparado com as plantas controles (linhagem 35S:NIK1-5). Porém, a expressão dos genes quiméricos *BAK1-NIK1* e *NIK1-BAK1* em *nik1* além de não reverter o fenótipo de Columbia, intensifica o fenótipo anão nas plantas transgênicas, se assemelhando ao fenótipo de crescimento defeituoso de *bak1-4* (Wang *et al.*, 2004). Uma vez que *nik1* possui o gene intacto de BAK1, os resultados indicam que possivelmente as proteínas quiméricas interfiram na atividade de BAK1 endógeno, atuando como genes transdominantes negativos e inibindo a via de sinalização a BRs. Tais fenótipos corroboram os resultados obtidos por Wang *et al.* (2008) que determinaram por meio de mutações pontuais em BAK1, que para o sinal induzido por BR passar do meio extracelular para o meio intracelular é necessário que ocorra fosforilação de resíduos de treonina específicos de BAK1 na porção intracelular tais como T450 e T455, os quais não estão presentes na quimera BAK1-NIK1, uma vez que o domínio intracelular de BAK1 foi substituído.

Expressão de BAK1-NIK1 resulta em um fenótipo anão mais acentuado do que aquele gerado pela expressão da quimera NIK1-BAK1 (Figura 7). Sabe-se que a interação de BAK1 e BRI1 não é dependente de fosforilação (Nan e Li, 2002), de forma que a quimera BAK1-NIK1 pode competir por ligação ao BRI1 com o BAK1 endógeno

por meio de seu domínio extracelular, impedindo a transdução do sinal induzido por BR. No caso de NIK1-BAK1, o fenótipo do mutante *bak1-4* não é totalmente resgatado, uma vez que NIK1 age regulando negativamente a via de resposta a BR por meio da ligação a BRI1, como comprovado pelo ensaio de duplo híbridos em leveduras. Competindo também desta forma, com BAK1 impedindo a transdução do sinal. Estes resultados sugerem que NIK1 pode interagir com BAK1 modulando a formação do complexo BRI1/BAK1/BR. Recentemente, foi demonstrado que NIK1 interage *in vivo* com BAK1 e FLS2 para inibir a resposta imune da planta (E.P.B. Fontes, comunicação pessoal), possibilitando a interferência genética de um receptor mutante sobre o outro normal.

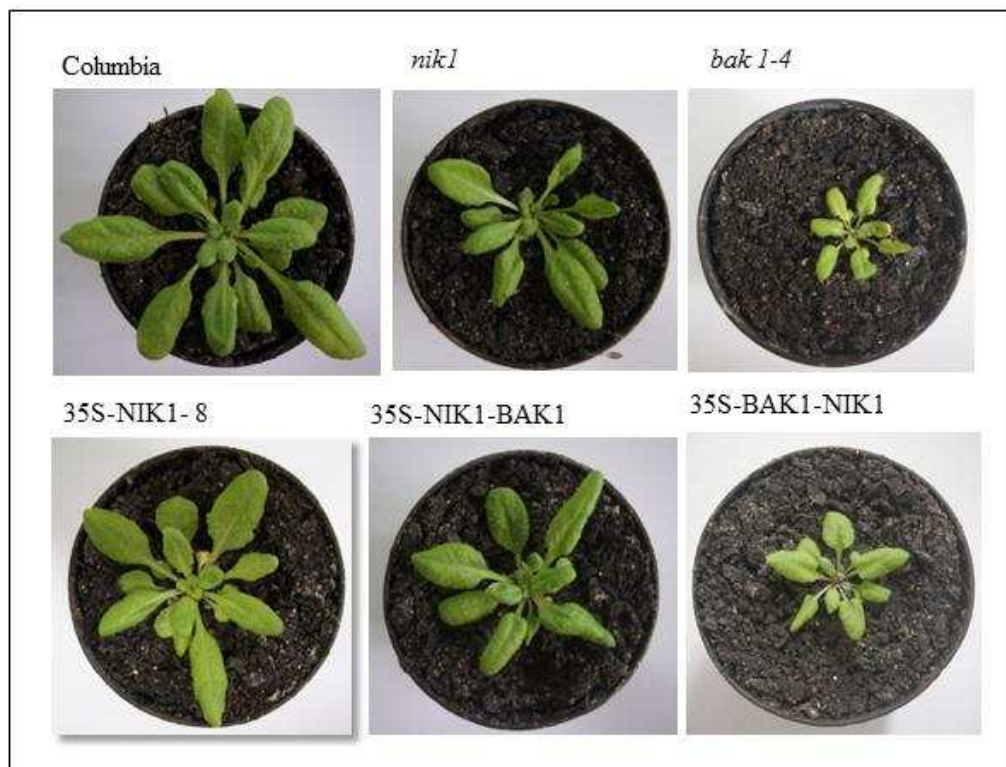


Figura 7 Fenótipos de *A. thaliana* ecotipo Columbia, mutantes nocautes para os genes NIK1 (*nik1*, Salk_060808) e BAK1 (*bak1* Salk_034523) e de linhagens *nik1* transformadas com 35S:NIK1-GFP e as proteínas quiméricas(35S:BAK1-NIK1 e 35S:NIK1-BAK1).

Como parâmetro adicional de desenvolvimento, foi avaliado o crescimento do hipocótilo na presença e ausência de luz (Figura 8A e 8B). Enquanto que o crescimento de hipocótilo de *bak1-4*, tanto na presença de luz como no escuro, foi reduzido em comparação à Col-0, o tamanho do hipocótilo de *nik1* foi similar ao controle; porém, no

escuro, foi observado, aos 14 dias de crescimento, um efeito negativo pela inativação do gene *NIK1* no crescimento do hipocótilo, embora menos acentuado do que aquele observado em *bak1-4*. Expressão dos genes quiméricos BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 no nocaute *nik1*, resultou em um efeito transdominante negativo sob BAK1 endógeno, uma vez que as plantas transformadas com os genes quiméricos mimetizando quantitativamente o fenótipo de *bak1-4*. No crescimento de hipocótilo na presença de luz. Entretanto, no escuro, observa-se que as plantas transgênicas NIK1-BAK1 apresentam um fenótipo mais fraco de hipocótilo reduzido do que as linhagens BAK1-NIK1, sugerindo que a quimera BAK1-NIK1 possa ter um efeito transdominante negativo sob BAK1 geneticamente predominante. Coletivamente, estes resultados de fotomormogênese e crescimento de plantas sugerem que NIK1 possa funcionar como um regulador negativo de vias de sinalização de desenvolvimento. Esta interpretação é baseada nos fenótipos resultantes da expressão de proteínas quiméricas contendo os domínios de NIK1, uma vez que o fenótipo de *nik1* com relação ao desenvolvimento é mascarado pela capacidade de NIK1 de funcionar como modulador negativo da resposta imune em plantas.

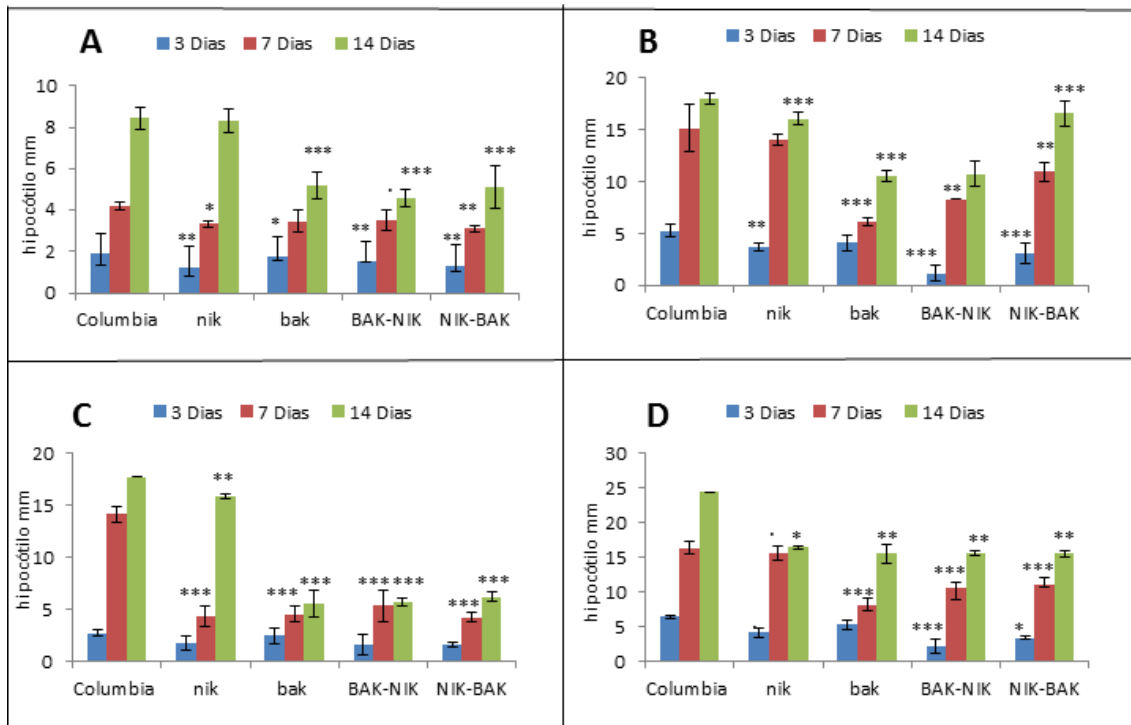


Figura 8 Crescimento de hipocótilo nos diferentes genótipos de *Arabidopsis thaliana* em meio MS puro e suplementado com BL a 2 μ M. (8A) Crescimento de hipocótilo na

presença de luz em meio MS puro. **(8B)** Crescimento de hipocótilo na ausência de luz em meio MS puro. **(8C)** Crescimento de hipocótilo na luz em meio MS suplementado com BL a 2 μ M. **(8D)**. Crescimento de hipocótilo na ausência de luz em meio suplementado com BL a 2 μ M. Barras seguidas de *, ** ou *** diferem significativamente de Columbia pelo teste T não paramétrico ao nível de significância de $p < 0.05$, $p < 0.01$ ou $p < 0.001$, respectivamente.

Constantemente as plantas estão sujeitas a encontrar uma variedade de patógenos e insetos herbívoros, e ao mesmo tempo precisam alocar recursos para o crescimento e desenvolvimento. Crescer ou defender torna-se então um desafio de vida ou morte, uma vez que tanto o crescimento e defesa requerem dispendiosos gastos energéticos. Portanto, programas de defesa estão desligados durante o crescimento normal. O contrário ocorre quando o vegetal é atacado por agentes patogênicos ou herbívoros, vias de resposta imune devem estar ativas, enquanto vias de crescimento e desenvolvimento devem estar desligadas para priorizar recursos e energia para a defesa (Chaiwanon *et al.*, 2016). Assim, equilibrando o balanço entre estas duas vias, o vegetal consegue se defender contra ataque de patógenos e crescer no momento oportuno, e isso envolve interações complexas entre as vias de sinalização de defesa e crescimento (Durán e Zipfel 2015; Wang e Wang, 2014). A função de NIK1 na defesa antiviral esta bem definida, uma vez que Zorzatto *et al.* (2015) descreveram o mecanismo de defesa mediado por NIK1 contra begomovírus. Recentemente, foi demonstrado que NIK1 age como regulador negativo na imunidade de plantas (Machado *et al.*, 2005). Os resultados da presente investigação indicam que NIK1 também pode estar envolvido na via de desenvolvimento por BRs como regulador negativo. Neste caso, o fenótipo de *nik1* deveria se opor ao fenótipo de BAK1 no desenvolvimento, ou seja, as plantas mutantes *nik1* deveriam ser maiores que Col-0. Uma vez que NIK1 também regula negativamente vias de defesa contra patógenos, o crescimento e desenvolvimento de *nik1* seria o resultado da ativação da via de sinalização por BRs que acelera o desenvolvimento e da ativação do sistema imune das plantas que retarda o desenvolvimento das plantas.

O efeito negativo de NIK1 no desenvolvimento está associado ao seu impacto na via de sinalização por BR.

Considerando a capacidade de NIK1 de interagir com BAK1, demonstrado previamente (E.P.B. Fontes, comunicação pessoal), e dos domínios de NIK1 de exercerem um efeito transdominante negativo sob BAK1 e no desenvolvimento, demonstrados na presente investigação, torna-se razoável supor que NIK1 estaria modulando negativamente a via de sinalização a BR. Para se avaliar o efeito das mutações e das proteínas quiméricas especificamente na sinalização por BR, o crescimento das plantas foi avaliado em meio suplementado com BL a 2 μm (Figura 8C, 8D e Figura 9).

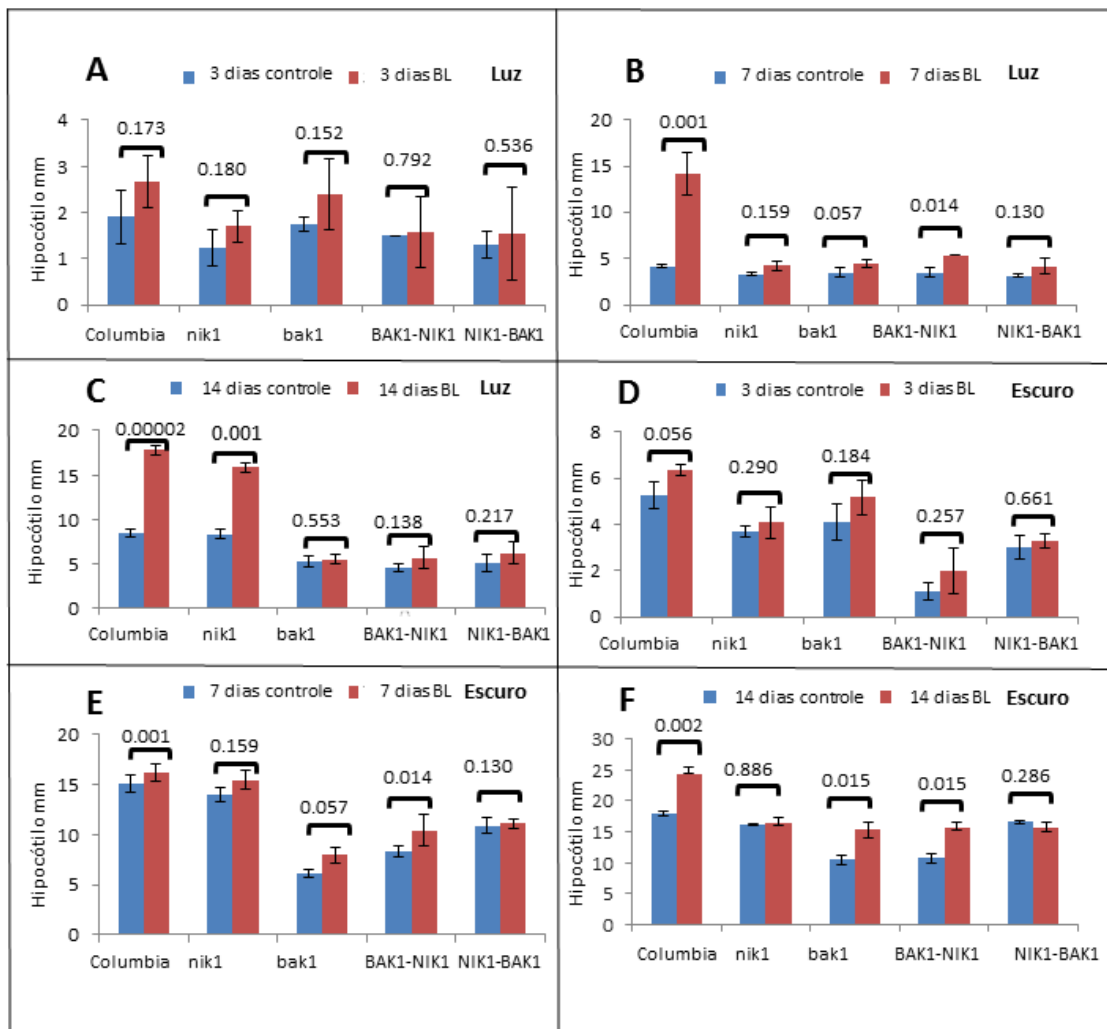


Figura 9 Efeito de BL no crescimento do hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*. Efeito do BL no crescimento de hipocótilos na luz com (9A) 3 (9B) 7 e (9C) 14 dias de desenvolvimento. Efeito do BL no crescimento de hipocótilos na ausência de luz com (9D) 3, (9E) 7 e (9F) 14 dias de desenvolvimento. O P valor de comparação das médias pelo teste T é mostrado acima das barras comparadas, significância > 0,05.

Enquanto que em Col-0 a adição de BL promoveu um incremento significativo no crescimento de hipocótilo sob condições de luz, que se intensificou com o tempo (compare a significância estatística de 3 até 14 dias após tratamento), o mutante *bak1-4* não respondeu ao tratamento com BL, não se observando o estímulo do hormônio no crescimento do hipocótilo, uma vez que *bak1-4* é insensível a BR (Figuras 8C e 9). Resultados similares foram encontrados por outros autores utilizando diferentes concentrações de BL ao meio, atingindo uma dose de 100 nM sem haver resposta significativa à adição de BL (Schwessinger *et al.*, 2011), sempre apresentando fenótipo de crescimento reduzido, semelhante ao mutante hipo-sensível à BR *br1* alelos nulos (Nam e Li 2002).

Como um possível modulador negativo da via de sinalização de BR, esperava-se que *nik1* apresentasse um fenótipo hipersensível a BR. Entretanto, considerando o estímulo ao alongamento do hipocótilo ocorrendo apenas após 14 dias, de tratamento com BL, a sinalização de BR parece ser ativada em *nik1* e em níveis inferiores ao controle Col-0. Uma vez que *NIK1* pertence a uma pequena família multigênica, sendo representada por pelo menos três parálogos no genoma de *Arabidopsis*, *NIK1*, *NIK2* e *NIK3*, é possível que, devido à redundância de função, não seja possível observar fenótipos em mutantes simples. Entretanto, a expressão das quimeras BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 no nocaute *nik1* restaurou o fenótipo de *bak1-4* insensível à BR, demonstrando a interferência negativa das quimeras em genótipos que expressam BAK1 normal, como *nik1* (Figura 9C).

Sob condições de escuro, na qual a sinalização de BR é altamente ativada com crescimento acentuado do hipocótilo, o estímulo pela adição de BL foi menor, mesmo no controle positivo Col-0 (Figuras 9D, 9E e 9F).

Mutantes deficientes de sinalização por BR apresentam fenótipos característicos e semelhantes entre si, incluindo estatura reduzida, folhas da roseta verde-escuro e compactadas, pelos radiculares anormais, desenvolvimento vascular irregular, floração atrasada e senescência, redução da fertilidade masculina, diminuição da germinação de sementes, fotomorfogênese e escotomorfogênese alterada (Clouse, 1996 e Kwon e Choe, 2005). Por meio das análises fenotípicas de plantas expressando as quimeras BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 é correto afirmar que estas plantas transgênicas são insensíveis à BR apresentando fenótipo característico condizente com o fenótipo de *bak1-4*. Coletivamente, estes resultados fenotípicos de desenvolvimento sugerem que

BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 regulam negativamente a via de resposta a BR, como já pressuposto por Machado et al., (2015).

Para confirmar o efeito negativo dos domínios de NIK1 na via de sinalização de BR, foi analisado o efeito de BL na expressão de genes marcadores associados à resposta a BR. Para isso, foram selecionados os genes *XTR6* e *IAA19*, regulados positivamente por BR. O gene *XTR6* codifica a enzima Xiloglucano endotransglicosilase 6, enzima esta que participa em modificações da parede celular necessárias para o alongamento celular, possuindo um papel chave na resposta a BR e outros reguladores de crescimento (Yin *et al.*, 2002). O gene *IAA19* codifica uma proteína reguladora da resposta à auxina também envolvida na regulação de genes relacionados com o desenvolvimento induzidos por auxina e por BRs (Gallego-Bartolome *et al.*, 2011). Zhou et al., (2013) mostraram que o mutante *xtr6* é insensível a BR, apresentando fenótipo característico de outros mutantes hipossensíveis a BR como o mutante *bzr1-d*, proteína chave na via de resposta a BRs.

Condizente com os fenótipos de crescimento de roseta e hipocótilo (Figuras 7 e 8), o gene *XTR6* nas linhagens BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 foi regulado negativamente em resposta a BL, em contraste às linhagens Col-0 e *nik1* complementada com 35S:NIK1-GFP (NIK1-8), (Figura 10). Embora *XTR6* tenha sido fracamente induzido na linhagem NIK1-8, quando comparado com Col-0, diferentemente das quimeras BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1, o gene *XTR6* na linhagem NIK1-8 responde positivamente à adição de BL ao meio, condizente com o crescimento da roseta característico dessa linhagem (Figura 7). De fato, NIK1-8 apresenta um fenótipo bem mais próximo de Columbia do que de *nik1*, *bak1-4* ou das linhagens transgênicas BAK1-NIK1, NIK1-BAK1. Porém a adição de BL ao meio reprimiu a expressão deste gene na linhagem T2 6.2 de BAK1-NIK1 e nas duas linhagens T1-7 e T1-9 de NIK1-BAK1.

Ensaio independentes de hibridizações em microarranjos de DNA identificaram o transcriptoma induzido por BR, incluindo no elenco de genes induzidos por BR, não somente o gene *XTR6*, mas também outros genes codificadores de enzimas que participam de modificações da parede celular, incluindo XETs, beta-1,4 glucanases, poligalacturonase, pectinesterase e expansinas (He et al., 2003; Mussig et al., 2002; Yin et al., 2002). Estes genes são de fundamental importância para o alongamento e divisão celular.

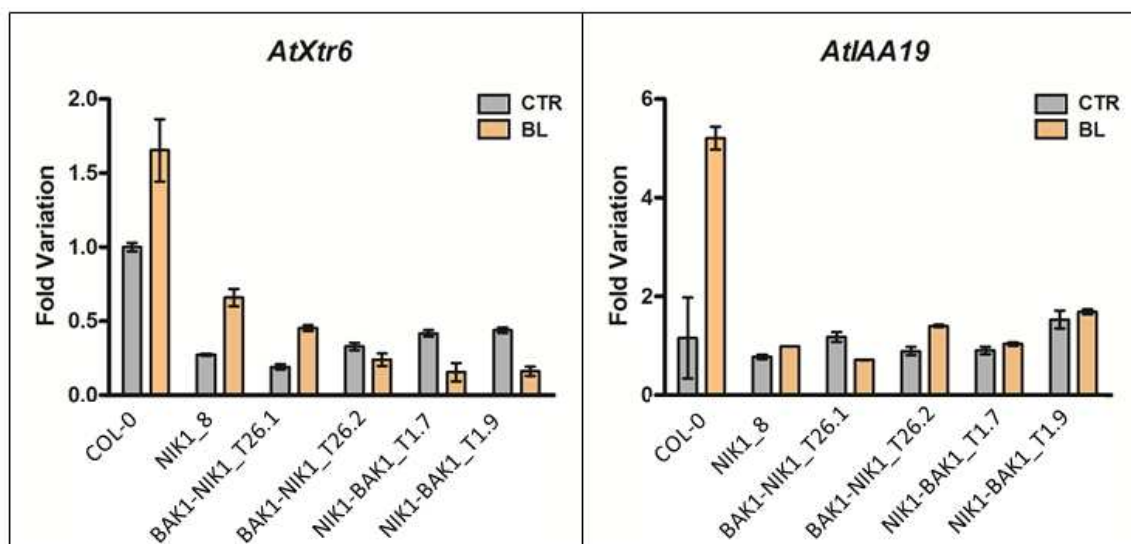


Figura 10 Acúmulo dos transcritos de genes marcadores da via de resposta a BR. qRT-PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para os genes (A) *XTR6* e (B) *IAA19* de *Arabidopsis thaliana*, crescidas em meio contendo BL a 2 μM ou controle sem adição de BL ao meio de crescimento. Os dados foram normalizados utilizando o gene *AtActina* e o gráfico foi plotado com os dados de expressão relativa dos genes em relação a linhagem controle não tratada (Columbia, CTR) utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. As plantas foram crescidas 48h em meio MS contendo BL.

Com relação ao gene *IAA19*, a adição de BL ao meio de crescimento induziu sua expressão em Col-0, sendo que nas demais linhagens transgênicas estudadas, o referido gene não foi induzido por BL indicando defeitos na sinalização por BR (Figure 9B). Estes resultados são condizentes com os fenótipos de crescimento da roseta e de hipocótilo das linhagens transgênicas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 (Figuras 7 e 8). A expressão do gene *IAA19* é induzida tanto por BR quanto por auxina (IAA), porém com cinéticas distintas. A expressão do gene *IAA19* após o tratamento com BL atinge o ponto máximo de indução com cinética tardia, enquanto que o ponto máximo após a indução de auxina ocorre com cinética mais precoce, sendo que o momento e o nível do pico de indução por BL são independentes da concentração de BL (Nakamura et al., 2003). Embora IAA e BL ativem *IAA19*, uma série de características distinguem indução por BL e por IAA. Indução por IAA é íngreme e transitória, possuindo um sistema de auto repressão (Hagen e Guilfoyle, 2002). Em contraste, a indução por BL é gradual e contínua, não havendo indícios para um sistema de auto repressão na indução por BL. Sendo assim, BL induz a expressão deste gene por um mecanismo diferente do

de auxinas. Além disso, a indução por IAA é dependente da dose e é mais elevada em concentrações mais elevadas, enquanto que a indução por BL é independente da dose entre 10 nM e 1 µM. Isto deve-se provavelmente porque a resposta BL é saturada a tratamentos com BL superiores a 10 nM (Nakamura et al., 2003). Baseado no perfil de indução dos genes *XTR6* e *IAA19* por BL, associado ao fenótipo de desenvolvimento e fotomorfogênese dos genótipos analisados, pode-se concluir que, assim como *bak1-4*, as linhagens BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 são deficientes quanto à capacidade de transmitir o sinal induzido por BR, e que BAK1-NIK1 apresenta uma acentuada insensibilidade a BL quando comparada a NIK1-BAK1.

Interação entre os domínios de cinase de BRI-1 e NIK1 em leveduras

Sendo as linhagens BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1 insensíveis a BR, e levando-se em consideração que as quimeras acumulam-se corretamente na membrana plasmática e são funcionais, uma vez que foram capazes de inibir a sinalização de BR em *nik1*, a hipótese consistente com estes resultados seria que as quimeras funcionem como alelos transdominantes negativos da função de BAK1. Esta hipótese é reforçada pela observação prévia de que NIK1 interage com BAK1 *in vivo* (E.P.B. Fontes, comunicação pessoal). Entretanto, não se sabe se NIK1 interage diretamente com BRI1 para inibir a via de sinalização por BR. Com a finalidade de determinar a capacidade do domínio cinase de NIK1 de interagir com BRI1, foi realizado o ensaio de duplo híbrido em leveduras. Os domínios cinases de BRI1 e de NIK1 foram fusionados tanto ao domínio de ligação (BD) quanto ao domínio de ativação (AD) de GAL4 e avaliados em pares quanto à capacidade de transativar o gene repórter *HIS3*. Os duplos transformantes foram plaqueados, em diferentes diluições, no meio SD-Leu-Trp para confirmar a transformação dupla, e no meio sem histidina e suplementado com 3AT, para confirmar interação entre as proteínas. Co-expressão dos domínios de cinase de BRI1 e NIK1 em leveduras conferiu prototrofia a histidina, demonstrando que o domínio de cinase de NIK1 interage com BRI1 em leveduras, assim como o domínio de cinase de BAK1, utilizado como controle positivo.

Levando-se em consideração que NIK1 interage com BAK1 *in vivo* e com BRI1 em leveduras na ausência de estímulos (Figura 11), e baseando-se nas análises de ativação da via de sinalização nas linhagens NIK1-BAK1 e BAK1-NIK1, um modelo de

atuação dos domínios de NIK1 na sinalização por BR é proposto (Figura 12). Neste modelo, em condições normais, tanto BRI1 quanto BAK1 formaria um complexo inativo com NIK1, nos mesmos moldes do complexo formado com BIK1. Em condições de síntese e sinalização a BR, o hormônio se ligaria a BRI1 promovendo a ligação com BAK1 e liberação dos inibidores BIK1 e NIK1. Sendo NIK1 um inibidor da via de sinalização de BR, o seu domínio cinase não complementa a função positiva do domínio cinase de BAK1 para a transdução de sinal. Sendo assim, em plantas expressando BAK1-NIK1, a presença do hormônio em eventos de desenvolvimento promoveria a dimerização tanto de BAK1 quanto de BAK1-NIK1 com BRI1, formando um complexo inativo para sinalização. Uma vez que a expressão de BAK1-NIK1 em plantas expressando BAK1 normal recapitulou os fenótipos típicos do nocaute *bak1*, pode-se interpretar que a quimera funciona com um alelo transdominante negativo para a função de BAK1. Em plantas expressando NIK1-BAK1, o receptor quimérico, por não ter o domínio LRR de BAK1, não seria sequestrado pelo receptor BRI1 na presença do hormônio. Na presente investigação, a quimera BAK1-NIK1 inibiu mais eficientemente a sinalização por BR do que a quimera NIK1-BAK1. Entretanto, não foi determinado se a eficiência com que o hormônio promove a dimerização de BRI1 com o domínio extracelular LRR é o fator determinante da inibição forte promovida pela quimera BAK1-NIK1. Alternativamente, uma baixa dependência de fosforilações em NIK1 mediadas por BAK1 para dissociação do complexo poderia justificar o fenótipo menos acentuado resultante da quimera NIK1-BAK1. É provável ainda que simplesmente a expressão diferenciada das quimeras nas plantas transgênicas justifique a intensidade do fenótipo resultante em cada linhagem. Para eliminar esta última hipótese, torna-se absolutamente necessário que a expressão gênica nas quimeras nas diferentes linhagens transgênicas seja quantificada.

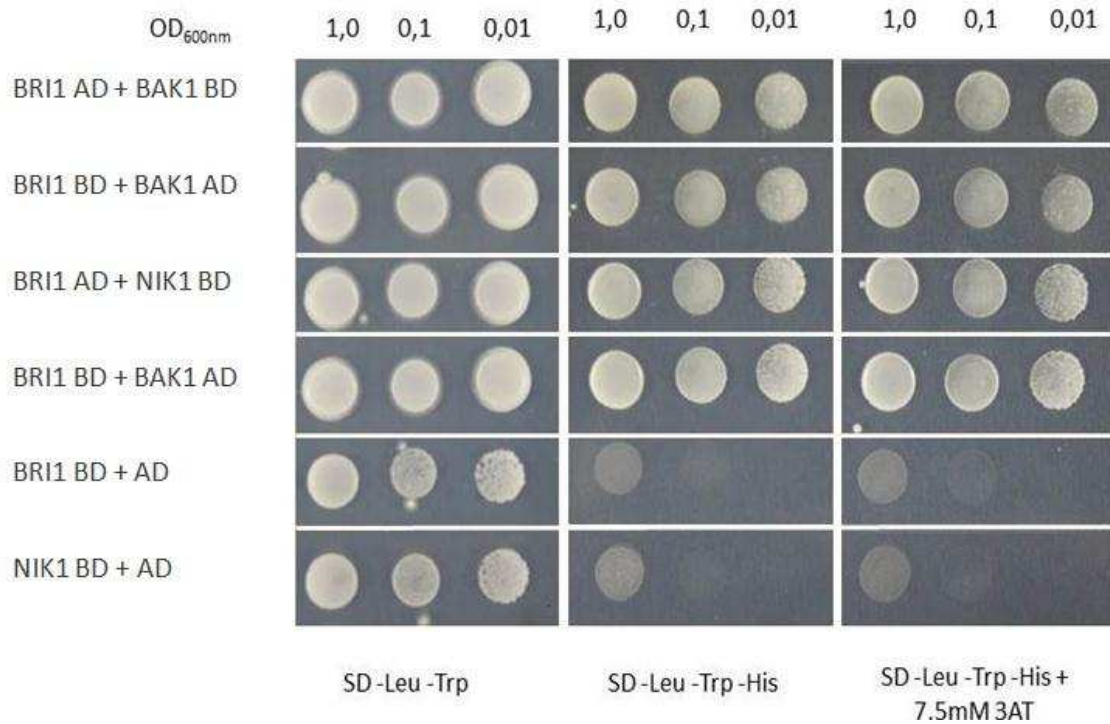


Figura 11 Leveduras cotrasnformadas com BD-NIK1 e AD-BRI1 apresentam prototrofia à histidina, indicando a interação das proteínas sinalizadoras NIK1 e BRI1. Células de levedura expressando as proteínas recombinantes indicadas foram avaliadas quanto à sua prototrofia à histidina, sendo plaqueadas em meio seletivo deficiente dos aminoácidos leucina, triptofano e histidina, suplementado com 7,5 mM de 3AT. Como controle positivo leveduras foram cotrasnformadas com AD-BRI1 e BD-BAK1 e controle negativo leveduras foram cotrasnformadas com BD-BRI1 e BD-NIK1, foram cotransformados com o AD de *GAL4*.

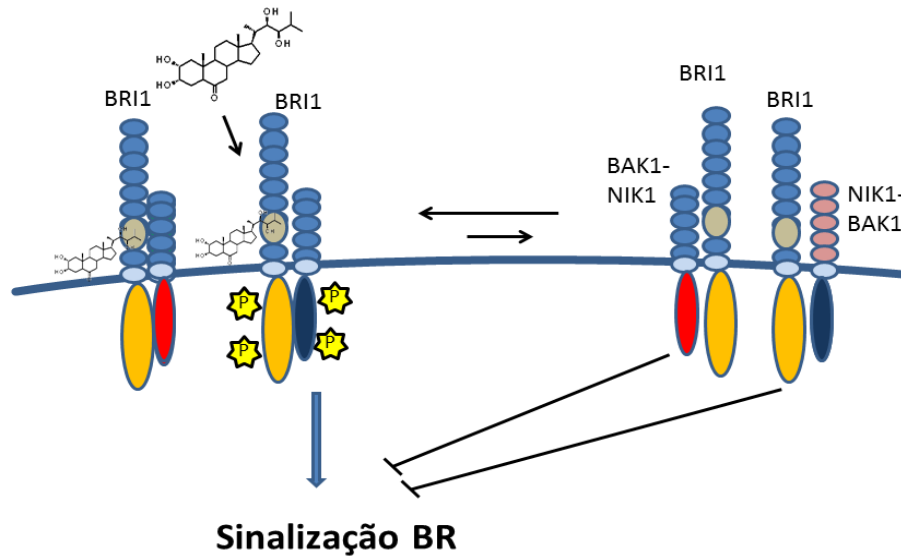


Figura 12 Via de sinalização mediada pelo receptor de membrana BRI1 em Arabidopsis, regulada por NIK1 e quimeras NIK1-BAK1 e BAK1-NIK1. Na ausência de BR, BRI1 encontra-se na sua forma inativa, na presença de BR, BRI1 recruta BAK1 para sua proximidade e dimeriza-se, a dimerização induz a transfosforilação dos domínios citoplasmático de ambas as proteínas culminado na ativação da cinase de BRI1. Na ausência de BR NIK1 se mantém ligada a BRI1 regulando negativamente a via de resposta a BR. A presença de BR induz a dissociação entre NIK1 e BRI1, BRI1 se liga a BAK1 e a via de resposta é ativada. As quimeras NIK1-BAK1 e BAK1-NIK1 regulam negativamente a via de resposta a BR, na ausência ou presença de BR a quimera NIK1-BAK1 regula a via negativamente da mesma forma que NIK1. Na ausência e na presença de BRs a quimera BAK1-NIK1 se liga a BRI1, porém, não a ativação da cinase e transmissão do sinal do meio exterior para o meio interior da célula, uma vez que na quimera BAK1-NIK1 estão ausentes sítios de fosforilação específicos de BAK1 necessários para a transdução do sinal do meio extracelular para o meio intracelular.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que NIK1 desempenha um duplo papel em processos bioquímicos na célula vegetal. O seu papel na via de defesa contra geminivírus já está bem definido, embora, ainda existam lacunas a serem descobertas, uma vez que não se sabe qual estímulo induzido pela infecção viral induz a fosforilação da Thr474 culminando na ativação da cinase. Nesta investigação, pela primeira vez, foi descrita a função de NIK1 como proteína reguladora da via de BRs, apresentando uma função similar à da proteína BKI1, a qual se mantém ligada a BRI1 regulando negativamente a via na ausência de BRs. Embora a função moduladora de NIK1 em vias de desenvolvimento não foi demonstrada por genética reversa, provavelmente devido à redundância de função dos parálogos de NIK1 em Arabidopsis, diversas linhas de evidência indicam que NIK1 regula negativamente a sinalização por BR. Inicialmente, foi demonstrado que a expressão das proteínas quiméricas BAK1-NIK1 e NIK1-BAK1, contendo os domínios funcionais de NIK1, causa redução global do crescimento, similarmente ao fenótipo de plantas deficientes na sinalização por BR, como *bak1-4*. Em segundo lugar, foi demonstrado que as proteínas quiméricas interferem diretamente na sinalização por BR, uma vez que o tratamento com BL não estimulou o alongamento do hipocótilo e, tampouco, induziu a expressão de genes marcadores associados à sinalização por BR nas linhagens transgênicas expressando os genes quiméricos. Estes resultados indicam que os transgênicos quiméricos funcionam como alelos transdominantes negativos na via de sinalização por BR. Finalmente, foi demonstrado, por meio de ensaio de duplo híbrido em leveduras, que o domínio cinase de NIK1 interage com o domínio cinase de BRI1, fundamentando a hipótese para a transdominância negativa dos alelos quiméricos na sinalização por BR. Considerando que foi demonstrado previamente que NIK1 também interage com BAK1, torna-se razoável propor um modelo de atuação que preconiza que, sob condições normais, NIK1 forma um complexo com BAK1 e BRI1, impedindo associação dos receptores na ausência de BR. Presença de BR provoca a dissociação de NIK1 e simultânea associação de BAK1 com BRI1, formando um complexo ativo para transdução do sinal de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, C.; RUSSINOVA, E.; KEMMERLING, B.; KWAAITAAL, M.; DE VRIES, S. C. *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase proteins serve brassinosteroid – dependent and independent signaling pathways. *Plant Physiology*. 148, 611- 619. 2008.

BENT, A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Agrobacterium Protocols, Humana Press*. 87 - 104. 2006.

BISHOP, G. J.; KONCZ, C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *The Plant Cell*. 14, 97- 110. 2002.

BRUSTOLINI, O. J.; MACHADO, J. P.; CONDORI-APFATA, J. A.; COCO, D.; DEGUCHI M.; LORIATO, V. A.; PEREIRA, W. A.; ALFENAS-ZERBINI, P.; ZERBINI, F. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; SANTOS, A. A.; CHORY, J., SILVA, F. F.; FONTES, E. P. B. Sustained NIK-mediated antiviral signalling confers broad-spectrum tolerance to begomoviruses in cultivated plants. *Plant Biotechnol J*. 13, 1300–1311. 2015.

CARVALHO, C. M.; SANTOS, A. A.; PIRES, S. R.; ROCHA, C. S.; SARAIVA, D. I. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. *PLoS Pathogens*. 4, 1000244-1000247. 2008.

CHAIWANON, J.; WANG, W.; ZHU, J. Y.; OH, E.; WANG, Z. Y. Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. *Cell*. 164(6), 1257-1268. 2016.

CHINCHILLA, D.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; KEMMERLING, B.; NURNBERGER, T.; JONES, J.D.G.; FELIX, G.; BOLLER, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*. 448, 497-500. 2007.

CLAEYS, H.; DE BODT, S.; INZÉ, D. Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends in Plant Science*. 19(4), 231-239.2014.

CLOUSE, S. D.; LANGFORD, M.; MCMORRIS, T. C. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology*, 111(3), 671-678.1996.

CLOUSE, S.D.; SASSE, J.M. BRASSINOSTEROIDS: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49, 427-451. 1998.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6, 850-861. 2005.

DIÉVART, A.; CLARK, S. E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*. 131, 251-261. 2004.

FONTES, E. P. B.; SANTOS, A. A.; LUZ, D.F.; WACLAWOVSKY, A. J.; CHORY, J. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes & Development*. 18, 2545-2556. 2004.

FRIEDRICHSEN, D. M.; JOAZEIRO, C. A.; LI, J.; HUNTER, T.; CHORY, J. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. *Plant Physiology*. 123(4), 1247-1256. 2000.

GALLEGO-BARTOLOME, J.; KAMI, C.; FANKHAUSER, C.; ALABADI, D.; BLAZQUEZ, M. A. A hormonal regulatory module that provides flexibility to tropic responses. *Plant Physiol*. 156, 1819–1825. 2011.

GAMPALA, S. S.; KIM, T. W.; HE, J.X.; TANG, W.; DENG, Z.; BAI, M.Y.; GUAN, S.; LALONDE, S.; SUN, Y.; GENDRON, J.M.; CHEN, H.; SHIBAGAKI, N.; FERL, R.J.; EHRHARDT, D.; CHONG, K. An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. 13, 177- 189. 2007.

GIETZ, R.D.; WOODS, R. A. Transformation of yeast by the liac/ss carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology*. 350, 87-96. 2002.

GODIARD, L.; SAUVIAC, L.; TORII, K.U.; GRENON, O.; MANGIN, B.; GRIMSLEY, N. H.; MARCO, Y. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant Journal*. 36(3), 353 - 65. 2003.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T.; FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*. 5, 1003-1011. 2000.

GROVE, M. D.; SPENCER, G. F.; ROHWEDDER, W. K.; MANDAVA, N. B.; WORLEY, J. F.; WARTHEN, J. D. J. R.; STEFFENS, G. L.; FLIPPEN-ANDERSON, J. L.; COOK, J. C. J. R. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*. 281, 216-217. 1979

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol*. 49: 373-385. 2002.

HALTER, T.; IMKAMPE, J.; MAZZOTTA, S.; WIERZBA, M.; POSTEL, S.; BÜCHERL, C.; KIEFER, C.; STAHL, M.; CHINCHILLA, D.; WANG, X.; NÜRNBERGER, T.; ZIPFEL, C.; CLOUSE, S.; BORST, J. W.; BOEREN, S.; VRIES, S. C.; TAX, F.; KEMMERLIN, B. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Curr. Biol*. 24, 134-143. 2014.

HE, J. X.; FUJIOKA, S.; LI, T. C.; KANG, S. G.; SETO, H.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA S.; JANG, J. C. Sterols regulate development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 131(3), 1258-1269. 2003.

HEESE, A.; HANN, D. R.; GIMENEZ-IBANEZ, S.; JONES, A. M.; HE, K.; LI, J.; SCHROEDER J. I.; PECK, S. C.; RATHJEN J. P.; The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (29), 12217-12222. 2007.

HEPWORTH, J.; AND LENHARD, M. Regulation of plant lateral organ growth by modulating cell number and size. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 36-42. 2014.

JEONG, Y. J.; SHANG, Y.; KIM, B. H.; KIM, S. Y.; SONG, J. H.; LEE, J. S.; LEE, M. M.; LI, J.; NAM, K. H. BAK7 displays unequal genetic redundancy with BAK1 in brassinosteroid signaling and early senescence in Arabidopsis. *Molecules and Cells.* 29, 259-266. 2010.

JIN, T-S.; STONE, J.M.; WALKER, J.C. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development.* 14, 108 - 117. 2000.

JOHNSON, K. L.; INGRAM, G. C. Sending the right signals: regulating receptor kinase activity. *Current opinion in plant biology.* 8 (6), 648-656. 2005.

JORDÁ, L.; SOPEÑA-TORRES, S.; ESCUDERO, V.; NUÑEZ-CORCUERA, B.; DELGADO-CEREZO, M.; TORII, K. U.; MOLINA, A. ERECTA and BAK1 receptor like kinases interact to regulate immune responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science.* 7, 1-13. 2016.

KARLOVA, R.; BOEREN, S.; RUSSINOVA, E.; AKER, J.; VERVOORT, J.; DE VRIES, S. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *The Plant Cell.* 18, 626-638. 2006.

KWON, M.; CHOE, S. Brassinosteroid biosynthesis and dwarf mutants. *Journal of Plant Biology.* 48(1), 1-15. 2005.

LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell.* 90, 929-938. 1997.

LI, J.; WEN, J.; LEASE, K. A.; DOKE, J.T.; TAX, F. E.; WALKER, J.C. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell.* 110, 213-222. 2002.

LIN, W.; LU, D.; GAO, X.; JIANG, S.; MA, X.; WANG, Z.; MENGISTE, T.; HE, P.; SHAN, L. Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 12114-12119. 2013.

LIN, W.; LI, B.; LU, D.; CHEN, S.; ZHU, N.; HE, P.; SHAN, L. Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* .111, 3632–3637.2014.

LOZANO-DURÁN, R.; ZIPFEL, C. Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in plant science*. 20 (1), 12-19. 2015.

MACHADO, J. P. B. (2011) Identificação e caracterização de alvos celulares da proteína NIG (NSP-interacting gtpase). Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa Minas Gerais-Brasil. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

MACHADO, J. P.; BRUSTOLINI, O. J.; MENDES, G. C.; SANTOS, A. A.; FONTES, E. P. NIK1, a host factor specialized in antiviral defense or a novel general regulator of plant immunity? *Bioessays*. 37 (11), 1236-1242. 2015.

MACHO, A. P.; LOZANO-DURÁN, R.; ZIPFEL, C. Importance of tyrosine phosphorylation in receptor kinase complexes. *Trends in plant science*. 20 (5), 269-272. 2015.

MARIANO, A. C.; ANDRADE, M. O.; SANTOS, A. A.; CAROLINO, S. M. B.; OLIVEIRA, M. L.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; BROMMONSHENKEL, S. H.; FONTES, E. P. B. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*. 318, 24-31. 2004.

McCARTY, D. R.; CHORY, J. Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell*. 103(2), 201-209. 2000.

MENG, X.; CHEN, X.; MANG, H.; LIU, C.; YU, X.; GAO, X.; TORII, K. U.; HE, P.; SHAN, L. Differential function of Arabidopsis SERK family receptor-like kinases in stomatal patterning. *Curr. Biol*. 25, 2361-2372. 2015.

MORA-GARCIA, S.; VERT, G.; YIN, Y.; CANO-DELGADO, A.; CHEONG, H.; CHORY, J. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes & Development*. 18, 448- 460, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol*. 15: 473-479. 1962.

MÜSSIG, C.; FISCHER, S.; ALTMANN, T. Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol*. 129:1241–1251. 2002.

NAKAMURA, A.; HIGUCHI, K.; GODA, H.; FUJIWARA, M. T.; SAWA, S.; KOSHIBA, T.; YOSHIDA, S. Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiology*. 133(4), 1843-1853. 2003.

NAM, K. H.; LI, J. BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid. *Cell*. 110, 203-212. 2002.

NOLEN, B.; TAYLOR, S.; GHOSH, G. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell*, 15, 661-666. 2004.

OH, M. H.; BENDER, K. W.; KIM, S. Y.; WU, X., LEE, S.; NOU, I. S.; ZIELINSKI, R. E.; CLOUSE, D. S.; HUBER, S. C. Functional analysis of the BRI1 receptor kinase by Thr-for-Ser substitution in a regulatory autophosphorylation site. *Frontiers in plant science*. 6. 2015.

OLIVEIRA, M. V. V.; XU, G.; LI, B.; SOUZA V. L.; MENG, X.; CHEN, X.; YU, X.; SOUZA, S. A.; INTORNE, A. C.; MANHÃES, A. M. E. A.; MUSINSKY, A. L.; KOIWA, H.; FILHO, G. A. S.; SHANET L. Specific control of Arabidopsis BAK1/SERK4-regulated cell death by protein glycosylation. *Nat. Plantas*. 2, 15202-15218. 2016.

PENG, P.; YAN, Z.; ZHU, Y.; LI, J. Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 through proteasome-mediated protein degradation. *Molecular Plant*. 1, 338-346. 2008.

POSTEL, S.; KÜFNER, I.; BEUTER, C.; MAZZOTTA, S.; SCHWEDT, A.; BORLOTTI, A.; HALTER, T.; KEMMERLING, B.; NÜRNBERGER, T. The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *European journal of cell biology*. 89 (2), 169-174. 2010.

ROCHA, C. C. S. Identificação de componentes da via de sinalização mediada por NIK, um receptor que interage com a proteína NSP de geminivírus. 2007. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

SAKAMOTO, T.; DEGUCHI, M.; BRUSTOLINI, O. J. B.; SANTOS, A. A.; SILVA, F. F ; Fontes, E. P. B. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biology*. 12, 229. 2012.

SANTIAGO, J.; HENZLER, C.; HOTHORN, M. Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science*. 341(6148), 889-892. 2013.

SANTOS, A. A.; CARVALHO, C. M.; FLORENTINO, L. H.; RAMOS, H. J. O.; FONTES, E.P.B. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *Plos ONE*. 4. 5781. 2009.

SANTOS, A. A.; LOPES, K. V. G.; APFATA, J. A. C.; FONTES, E. P. B. NSP-interacting kinase, NIK: a transducer of plant defence signalling. *Journal of Experimental Botany*. 61, 3839-3845. 2010.

SCHULZE, B.; MENTZEL, T.; JEHL, A. K.; MUELLER, K.; BEELER, S.; BOLLER, T.; FELIX, G.; CHINCHILLA, D. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated

kinase BAK1. *The Journal of Biological Chemistry*. 285, 9444-9451. 2010.

SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 389-395. 2008.

SHAN, L. Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110, 12114-12119. 2013.

SHIU, S.; H, BLEECKER, A. B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science STKE*. 113: re22. 2001.

SHIU, S.; H, BLEECKER, A. B. Expansion of the receptor-like kinase pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 132, 530-543. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TANG, W.; DENG, Z.; OSES-PRIETO, J. A.; SUZUKI, N.; ZHU, S.; ZHANG, X.; BURLINGAME, A. L.; WANG, Z. Y. Proteomic studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Molecular & Cell Proteomics*. 7, 728-738. 2008.

TANG, J.; HAN, Z.; SUN, Y.; ZHANG, H.; GONG, X.; CHAI, J. Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase . *Cell Res*. 25, 110-120. 2015.

TATEMATSU, K.; KUMAGAI, S.; MUTO, H.; SATO, A.; WATAHIKI, M. K.; HARPER, R. M.; LISCUM, E.; YAMAMOTO, K. T. *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 16 (2), 379-393.2004.

VERONESE, P.; NAKAGAMI, H.; BLUHM, B.; ABUQAMAR, S.; CHEN, X.; SALMERON, J.; DIETRICH, R. A.; HIRT, H.; MENGISTE, T. The membrane-anchored BOTRYTIS INDUCED KINASE1 plays distinct roles in Arabidopsis resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*. 18, 257-273. 2006.

VERT, G.; CHORY, J. Downstream nuclear events in brassinosteroid signaling. *Nature*. 441, 96-100. 2006.

WANG, R.; ZHANG, Y.; KIEFFER, M.; YU, H.; KEPINSKI, S.; ESTELLE, M. HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nature communications*,7. 2016.

WANG, X.; GOSHE, M. B.; SODERBLOM, E. J.; PHINNEY B. S.; KUCHAR, J. A.; LI, J.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S.; HUBER, S. C.; CLOUSE, S. D. Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *The Plant Cell*. 17,1685-1703. 2005.

WANG, X.; CHORY, J.; Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science*. 313, 1118-1122. 2006.

WANG X.; KOTA, U.; HE, K.; BLACKBURN, K.; LI, J.; GOSHE M. B.; HUBER, S. C.; CLOUSE, S. D.; Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell*. 15, 220–235. 2008.

WANG, Z.Y.; SETO, H.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S.; CHORY, J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*. 410, 380-383. 2001.

WANG, Z. Y.; BAI, M. Y.; OH, E.; ZHU, J. Y. Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annual review of genetics*. 46, 701-724. 2012.

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. The cell surface leucine-rich repeat

receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(26), 10104-10109. 2006.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. BRYAN, A. C.; TAX, F. E.; RYAN, C. A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 22(2), 508-522. 2010

YANG, C. J.; ZHANG, C.; LU, Y. N.; JIN, J. Q.; WANG, X. L. The mechanism of brassinosteroids action: from signal transduction to plant development. *Molecular Plant*. 4, 588-600. 2011.

YIN, Y.; WANG, Z. Y.; MORA-GARCIA, S.; LI, J.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*. 109:181–191.2002.

YIN, Y.; WU, D.; CHORY, J. Plant receptor kinases: systemin receptor identified. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99(14), 9090-9092. 2002.

YIN, Y.; VAFEADOS, D.; TAO, Y.; YOSHIDA, S.; ASAMI, T.; CHORY, J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell*.120, 249–259.2005.

ZHAO, B.; LV, M.; FENG, Z.; CAMPBELL, T.; LISCUM, E.; LI, J. TWISTED DWARF 1 Associates with BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 to Regulate Early Events of the Brassinosteroid Signaling Pathway.*Molecular plant*, 9(4), 582-592. 2016.

ZHOU, X. Y.; SONG, L.; XUE, H. W. Brassinosteroids regulate the differential growth of Arabidopsis hypocotyls through auxin signaling components IAA19 and ARF7. *Molecular plant*. 6(3), 887-904. 2013.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L.; OAKELEY, E.J.; JONES, J.D.G.; FELIX, G.; BOLLER, T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*. 428, 764-767. 2004.

ZIPFEL, C.; KUNZE, G.; CHINCHILLA, D.; CANIARD, A.; JONES, J. D.; BOLLER, T.; FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium* mediated transformation. *Cell*. 125(4), 749- 60. 2006.

ZORZATTO, C.; J. P. B. MACHADO.; K. V. G. LOPES.; K. J. T. NASCIMENTO.; W. A. PEREIRA.; O. J. B. BRUSTOLINI.; P. A. B. REIS.; I. P. CALIL.; M. DEGUCHI.; G. SACHETTO-MARTINS.; B. C. GOUVEIA.; V. A. P. LORIATO.; M. A. C. SILVA.; F. F. SILVA.; A. A. SANTOS.; J. CHORY.; E. P. B. FONTES. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature*, 520, 679–682. 2015.