



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA VIA DE SINALIZAÇÃO DE  
DEFESA ANTIVIRAL MEDIADA POR UM RECEPTOR  
DE MEMBRANA DO TIPO CINASE (NIK) ATRAVÉS  
DE INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA NSP DE  
GEMINIVÍRUS**

*Anésia Aparecida dos Santos  
Doctor Scientiae*

**VIÇOSA**

***MINAS GERAIS - BRASIL***

***2007***

**ANÉSIA APARECIDA DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA VIA DE SINALIZAÇÃO DE DEFESA  
ANTIVIRAL MEDIADA POR UM RECEPTOR DE MEMBRANA DO TIPO  
CINASE (NIK) ATRAVÉS DE INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA NSP DE  
GEMINIVÍRUS**

**Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Melhoramento para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA**

***MINAS GERAIS - BRASIL***

***2007***

À minha amada família, meu exemplo de força e coragem, dedico meu trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento – UFV, pela oportunidade.

Ao CNPq, pelo financiamento de meu trabalho, através da concessão de bolsa.

À Prof.<sup>a</sup> Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pela ótima orientação, pelo apoio e companheirismo.

Aos professores Francisco Murilo Zerbini Jr. e Maria Cristina Baracat Pereira pelo apoio científico e aos professores Marcelo Ehlers Loureiro e Gilberto Sachetto Martins pela participação na banca de tese.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, sempre dispostos a ajudar.

**Aos amigos e companheiros do Laboratório, que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, em especial, a Lílian Hasegawa Florentino, pela amizade e apoio científico, a Anete, a Eliciane e ao Maximiller pela cooperação.**

Aos amigos e companheiros do BIOAGRO pela convivência e apoio.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. CAPÍTULO I .....	5
ABSTRACT .....	5
INTRODUCTION .....	6
METHODS .....	10
RESULTS .....	15
DISCUSSION .....	25
REFERENCES .....	30
III. CAPÍTULO II .....	33
RESUMO .....	34
INTRODUÇÃO .....	35
MATERIAL E MÉTODOS .....	39
Construção de DNA, expressão e purificação de proteínas recombinantes .....	39
Purificação de proteínas fusionadas a GST .....	40
Ensaio de fosforilação .....	40
RT-PCR e qRT-PCR .....	41
Material vegetal, condições de crescimento, genotipagem e transformação .....	42
Localização subcelular .....	42
Inoculação de CaLCuV e análise de plantas <i>A. thaliana</i> infectadas .....	43
RESULTADOS .....	44
Alinhamento e identificação de resíduos de aminoácidos conservados em RLK's .....	44
Sítios de fosforilação na alça de ativação de NIK1 têm funções distintas .....	46

Inibição da atividade cinase de NIK1 por NSP.....	50
Identificação de substrato endógeno da proteína NIK1 .....	50
Capacidade de fosforilação de substratos das proteínas NIK mutadas e truncadas .....	52
O domínio cinase é requerido para sinalização anti viral mediada por NIK1 .....	54
DISCUSSÃO .....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
IV. ANEXOS.....	67

## RESUMO

SANTOS, Anésia Aparecida dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.

**Identificação de uma via de sinalização de defesa antiviral mediada por um receptor de membrana do tipo cinase (NIK) através de interação com a proteína NSP de geminivírus.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Orientadores: Francisco Murilo Zerbini Júnior e Sérgio Hermínio. Brommonshenkel.

Geminivírus constituem um grupo de vírus com genoma composto de DNA de fita simples que se replicam no núcleo de células do hospedeiro através de um intermediário dupla fita, podendo ser constituídos por um genoma mono ou bi-segmentado. O transporte do DNA viral do núcleo para o citoplasma de geminivírus bi-segmentados requer a proteína viral designada NSP, *Nuclear Shuttle Protein* (BV1). A localização de NSP e seu papel proposto no movimento célula-a-célula do DNA viral predizem que podem ocorrer interações com fatores do hospedeiro tanto no citoplasma quanto no núcleo. Inicialmente foi demonstrado que a proteína NSP de geminivírus que infecta *Arabidopsis*, *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) interage com receptores cinase (RLK) contendo repetições ricas em leucina (LRR) designadas NIK (NSP-Interacting Kinase). A interação NSP-NIK foi mapeada em NIK1 e ocorre através de uma região de 81 resíduos de aminoácidos do domínio cinase (aa 422-502) que compreende o potencial sítio ativo ser/tre cinase (subdomínio VIb-HrDvKssNxLLD) e a alça de ativação (subdomínio VII-DFGak/rx, mais subdomínio VIII - GtxGyiaPEY). A proteína comportou-se como um autêntico receptor cinase, sofrendo autofosforilação *in vitro*. Sendo, entretanto, a atividade cinase inibida pela proteína NSP. A fim de analisar o papel biológico da interação NSP-NIK, ensaios de infecção foram realizados em plantas contendo alelos nulos para o gene *NIK1*. Estes resultados demonstraram que a inativação dos alelos *NIK1* e *NIK3* aumentou a suscetibilidade à infecção causada pelo CaLCuV. Dada a sobreposição do domínio de interação com NSP com domínios regulatórios, foram realizados estudos bioquímicos através de mutagênese sítio dirigida em *NIK1*. A fim de mapear os sítios envolvidos na ativação da fosforilação de NIK1, o resíduo Thr-474 na alça de ativação foi substituído para resíduos de Ala, Asp ou Glu. Além disso, os resíduos Thr-468, Thr-469 e Ser-465 foram trocados por Ala. Foi demonstrado que a proteína receptora NIK1 exibe um padrão complexo de sítios de fosforilação, que agem independentemente em reações de transfosforilação e fosforilação de substratos. O resíduo de Thr-474 possui um papel central na ativação da proteína cinase, uma vez que os mutantes T474A e T474E apresentaram baixas atividades de auto e fosforilação do substrato. Similarmente, substituição do resíduo Gly-473 por Val juntamente com

substituição de Thr-474 por Ala aboliu a autofosforilação e a fosforilação do substrato, sugerindo que, esta mutação acarreta modificações estruturais da alça de ativação que promovem impedimentos estéricos. Em contraste, a substituição dos resíduos Thr-469 e Ser-465 por alaninas não causou impacto acentuado na autofosforilação, mas aumentou a atividade de fosforilação do substrato. Provavelmente, fosforilação desses resíduos provocam um efeito inibitório na atividade cinase. Além disso, foram conduzidos experimentos de complementação em *A. thaliana* nocautes para *NIK*. Com complementação de *NIK1* restaurou o fenótipo selvagem com a diminuição da suscetibilidade ao vírus. Em contraste, a expressão de *NIK1* mutante com o domínio cinase inativo não reverteu o fenótipo do nocaute *nik1*, mantendo a elevada taxa de infecção. Estes resultados suportam o argumento de que o domínio cinase de *NIK1* media uma via de sinalização que culmina em uma resposta de defesa.

## ABSTRACT

SANTOS, Anésia Aparecida dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007.

**Identification of a receptor-like kinase (NIK) mediated antiviral defense signaling pathway through interaction with the geminivirus nuclear shuttle protein, NSP.**

Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Francisco Murilo Zerbini Júnior and Sérgio H. Brommonschenkel.

Geminiviruses are small, single-stranded DNA viruses that replicate through double-stranded DNA intermediates in the nuclei of their plant hosts and can be mono or bipartite. The transport of bipartite viral DNA from the nucleus to the cytoplasm requires the viral protein NSP, and the nuclear shuttle protein NSP (BV1), both required for systemic infection. The localization of NSP and its proposed role in cell-to-cell movement of the viral DNA predict that interactions with host factors may occur in both the cytoplasm and the nucleus. Initially we have demonstrated that the NSP from an *Arabidopsis*-infecting geminivirus, *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) interacts with a leucine rich repeat (LRR)-receptor like kinases (RLK) designated NIK (NSP-Interacting Kinase). The NSP-NIK interaction occurs in NIK1 through an 81 amino acid region of the kinase domain (aa 422-502) that encompasses the putative active site for ser/thr kinases (sub-domain VIb-HrDvKssNxLLD) and the activation loop (sub-domain VII-DFGak/rx, plus subdomain VIII-GtxGyiaPEY). The protein behaved like authentic receptor kinase undergo autophosphorylation *in vitro*. However, NSP protein inhibits the kinase activity. To unravel the biological significance of the NSP-NIK interaction we have selected *nik* null alleles for infection assays. Inactivation of *NIK1* and *NIK3* alleles enhanced the susceptibility to geminivirus infection. Given the overlap of the NSP-interacting domain with regulatory domains for kinase activity, we focused on site-directed mutagenesis studies on *NIK1*. To map the phosphorylation sites involved in activation of NIK1, we have replaced Thr-474 in the activation loop by Ala, Asp or Glu residues, whereas Thr-468, Thr-469 and Ser 465 were replaced by Ala. We found that NIK1 exhibits a complex pattern of phosphorylation sites that function independently in auto- and in substrate phosphorylation. The Thr-474 residue

seems to play a pivotal role in the activation of the kinase protein, since the mutants T474A and T474E exhibited low auto- and substrate phosphorylation activities. Furthermore, the replacement of Gly-473 by Val in addition to Thr-474 by Ala abolished autophosphorylation and phosphorylation of substrate, suggesting that this mutation promotes a structural rearrangement of the A-loop that compromises activity. In contrast, the replacement of Thr-469 and Ser-465 for alanines did not impact autophosphorylation significantly, but increased substrate phosphorylation activity. Possibly the phosphorylation of these residues impairs the kinase activity. In addition, we conducted complementation experiments in the *nik1* genetic background. *NIK1* expression in *nik1* complemented the mutant and restored the wild type phenotype, with decreased virus susceptibility. In contrast, an inactive kinase domain-containing NIK1 mutant did not reverse the enhanced susceptibility phenotype of the knock-out lines and kept a high infection rate. These results are consistent with a model in which the kinase domain of NIK mediates a signaling pathway that culminates in antiviral defense.

# INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* representa um grupo de vírus de planta cujo genoma é empacotado na forma de DNA fita simples em partículas icosaédricas geminadas (Sunter and Bisaro, 1992 e Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999), que é convertido em forma de fita dupla no núcleo de células diferenciadas de plantas. Espécies pertencentes a esta família são agrupadas em quatro gêneros denominados: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus* de acordo com o inseto vetor, a gama de hospedeiro, a organização genômica, que pode ser bi ou monopartida, e o relacionamento filogenético, (Rybicki *et al.*, 2000 e Van Regenmortel *et al.*, 2005).

Todos os geminivírus encontrados até o presente no Brasil estão classificados no gênero *Begomovirus*, cujo representante típico é a espécie *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) e são transmitidos para dicotiledôneas pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Membros do gênero *Begomovirus* possuem predominantemente dois componentes genômicos, denominados DNA-A e DNA-B, que possuem aproximadamente o mesmo tamanho e nenhuma homologia de seqüência, exceto por uma estrutura em forma de grampo e uma seqüência denominada região comum (CR), que contém a origem de replicação dos geminivírus (Fontes *et al.*, 1994 a, b, Figura 2.2). Uma exceção é o *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), que apresenta 80% de homologia entre as seqüências das regiões comum do DNA-A e DNA-B (Hill *et al.*, 1998). A região comum possui uma seqüência invariável de nove nucleotídeos (TAATATT↓AC), que é clivada pela proteína viral de iniciação da replicação, Rep, também chamada de AC1 ou AL1 (Raghavan *et al.*, 2004).

O DNA-A apresenta o potencial para codificar cinco produtos gênicos (*AVI* ou *CP*, *AC1* ou Rep, *AC2* ou TrAP, *AC3* ou Ren e *AC4*), destes *AVI* ou *CP* é transcrito no sentido viral (Lazarowitz, 1992), e os genes *AC1* (proteína Rep – replicação), *AC2* (proteína TrAP – proteína de transativação) e *AC3* (proteína Ren – ativadora da replicação) são transcritos no sentido complementar (Sunter *et al.*, 1990; 1992; Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994). Além disso, há também a ORF *AC4*, transcrita no sentido complementar, que apresenta função diferenciada. Nos monopartidos, está relacionada com o desenvolvimento de sintomas sistêmicos (Jupin *et al.*, 1994) e nos bisegmentados sua função é desconhecida, mas sabe-se que mutações nessa ORF não resultam em qualquer alteração no fenótipo de plantas infectadas (Gröning *et al.*, 1994). Em alguns vírus emergentes, como ToCMV ("*Tomato chlorotic mottle virus*"), é também verificada a presença de um novo gene *AC5* no DNA-A, que é complementar ao gene *AVI*, e cuja função ainda não foi elucidada (Galvão *et*

*al.*, 2003). Em resumo o componente A está envolvido na replicação, ativação transcricional de genes virais e encapsidação do genoma viral (Sunter *et al.*, 1990, Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994).

O DNA-B apresenta dois genes, *BVI*, na fita viral, e *BCI*, na fita complementar, que expressam proteínas que atuam de maneira cooperativa para mediar o movimento intra e intercelular do DNA viral (Lazarowitz *et al.*, 1999; Gafni *et al.*, 2002), uma vez que na ausência das mesmas, os vírus são incapazes de se movimentarem na planta hospedeira (Elmer *et al.*, 1988). O gene *BCI* codifica a proteína MP (“*Movement Protein*”), responsável pelo movimento célula-a-célula do vírus via plasmodesmas, e o gene *BVI*, codifica a proteína NSP (“*nuclear shuttle protein*”), responsável pelo movimento do DNA viral entre núcleo e citoplasma, sendo ambas necessárias para a patogenicidade de geminivírus bisegmentados (Ingham *et al.*, 1995). Existem dois modelos de atuação das proteínas de movimento e transporte do DNA viral (Noueiry *et al.*, 1994; Sanderfoot, and Lazarowitz, 1996). De acordo com estes modelos, ambas as proteínas de movimento são requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. NSP transporta o DNA viral entre o núcleo e o citoplasma e atua cooperativamente com MP promovendo o movimento célula-a-célula do DNA viral através dos plasmodesmas.

Considerando a localização subcelular de NSP e seu papel proposto no movimento intra- e intercelular do DNA viral pode-se prever interações com fatores do hospedeiro tanto no citoplasma quanto no núcleo. De fato, foi demonstrado que NSP interage com uma acetilase nuclear de *Arabidopsis thaliana*, designada AtNSI (*NSP interactor*) (McGarry *et al.*, 2003), sendo capaz de inibir sua ação acetilase e com uma proteína tipo PERK (*proline-rich extensin-like receptor protein kinase*) denominada NsAK (*NSP associated kinase*), localizada na membrana plasmática, a qual atua na fosforilação de NSP (Florentino *et al.*, 2006). Através de ensaio de duplo híbrido, foi demonstrado que o domínio cinase de receptores de membrana de tomate (LeNIK-*Lycopersycum esculentum NSP-interacting kinase*) e soja (GmNIK-*Glycine max NIK*) interagem com a proteína NSP. Esta interação foi confirmada em ensaios de interação proteína-proteína *in vitro* (Mariano *et al.*, 2004).

Receptores do tipo proteína cinase (*Receptor-like protein kinases*, RLK) são receptores transmembrana que possuem uma organização estrutural conservada, caracterizada por uma porção amino-terminal extra-citoplasmática seguida de uma região transmembrana, um sítio de ligação a nucleotídeos (*nucleotide binding site* - NBS) e um suposto domínio citoplasmático serina/treonina cinase relacionado com sinalização celular (Belkhadir *et al.*, 2004). A análise da seqüência completa de aminoácidos deduzida de GmNIK demonstrou que a proteína receptora está estruturalmente organizada em um

domínio extracitoplasmático rico em repetições de leucinas (*leucine rich repeat* - LRR), além de seu domínio citoplasmático serina/treonina cinase (Mariano et al., 2004). Em *Arabidopsis*, cuja seqüência do genoma é conhecida, os receptores do tipo cinase com domínios ricos em repetições de leucinas (LRR) foram identificados e classificados em 13 sub-famílias (LRR I-XIII), variando de 3 a 26 repetições. Baseado em análises comparativas de seqüências e na organização do domínio LRR, GmNIK e LeNIK são mais relacionadas com os membros da subfamília LRR II-RLK de *Arabidopsis*, pertencentes à família de receptores do tipo serina/treonina cinase.

A subfamília LRR II-RLK é constituída por 14 proteínas, caracterizadas por possuírem no domínio extracelular cinco repetições ricas em leucina arranjadas em um único bloco contínuo, das quais, quatro são ditas completas, possuindo 24 resíduos de aminoácidos, com a quinta repetição apresentando 16 resíduos (Zhang *et al.*, 2006). Membros dessa subfamília com funções conhecidas incluem SERK1 (Hecht et al., 2001) e BAK1 (Li *et al.*, 2002), ambas envolvidas com desenvolvimento. A proteína SERK1 está associada ao desenvolvimento do óvulo e à embrionogênese precoce (Clark et al., 1997), enquanto que a proteína BAK1 está envolvido em percepção e sinalização de brassinosteróides (Li et al., 2002). Considerando toda a subfamília LRR-RLK, além de proteínas envolvidas em desenvolvimento, alguns membros têm sido caracterizados como proteínas de defesa, associados à resposta contra patógenos. Exemplos dessa classe incluem os genes *Xa-21* de arroz (Song *et al.*, 1995) e *FLS2* de *Arabidopsis* (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Por analogia conceitual, GmNIK and LeNIK poderiam estar envolvidas tanto em desenvolvimento quanto em defesa, ou em ambos.

Com a finalidade de elucidar a função da proteína NIK no hospedeiro e de identificar a relevância biológica da interação NIK-NSP no ciclo de vida do vírus, nesta investigação, todo o sistema experimental e os ensaios biológicos de infecção foram transferidos para a planta modelo *Arabidopsis*. Nesta, os homólogos de *GmNIK* podem ser identificados por comparação de seqüências, e estudos de genética reversa, para endereçar a função gênica, são possíveis. Assim sendo, o capítulo I descreve a identificação e caracterização bioquímica e genética dos ortólogos de *GmNIK* e *LeNIK* em *Arabidopsis*, associado à caracterização bioquímica da interação NIK-NSP e ensaios de infectividade em plantas nocaute. O capítulo II estende a caracterização bioquímica do domínio de cinase de NIK, decifrando o mecanismo bioquímico de ativação da cinase com a proposição de um modelo de atuação da proteína NSP como inibidora da atividade de NIK. Além disso, foram conduzidos ensaios de infectividade em genótipos expressando a proteína mutada, indicando que a via de sinalização iniciada pela proteína NIK1 requer seu domínio cinase ativo para desencadear a

resposta de defesa. Coletivamente, os resultados dessa investigação sugerem que a proteína NIK1 atua efetivamente na via de sinalização de resposta à infecção viral.

## CAPÍTULO I

### **The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity**

Elizabeth P. B. Fontes<sup>1,3</sup>, Anesia A. Santos<sup>1</sup>, Dirce F. Luz<sup>1</sup>, Alessandro J. Waclawovsky<sup>1</sup> and Joanne Chory<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOGRO/UFV, 36571.000, Viçosa, MG, Brazil and <sup>2</sup>Howard Hughes Medical Institute and Plant Biology Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US

## ABSTRACT

Despite the large number of leucine-rich-repeat (LRR) receptor-like-kinases (RLKs) in plants and their conceptual relevance in signaling events, functional information is restricted to a few family members. Here we describe the characterization of new LRR-RLK family members, as virulence targets of the geminivirus NSP (nuclear shuttle protein). NSP interacts specifically with three RLL-RLKs, AtNIK1, AtNIK2 and AtNIK3, through an 80-aa region that encompasses the kinase active site and A-loop. We demonstrated that these NSP-interacting kinases (NIK) are membrane-localized proteins with biochemical properties of signaling receptors. They behave as authentic kinase proteins that undergo autophosphorylation and also phosphorylate exogenous substrates. Autophosphorylation occurs via an intermolecular event and oligomerization precedes the activation of the kinase, as predicted by the schematic of receptor function. Binding of NSP to NIK inhibits its kinase activity, suggesting that NIK is involved in antiviral defense response. This hypothesis was corroborated by infectivity assays showing a positive correlation between infection rate and inactivation of *AtNIK1* and *AtNIK3* gene expression. Our data are consistent with a model in which NSP acts as virulence factor to suppress NIK-mediated antiviral responses.

## INTRODUCTION

Receptor-like protein kinases (RLK) are a diverse group of membrane-spanning proteins with a predicted signal sequence and a cytoplasmatic kinase domain that have been implicated in a wide range of signal transduction pathways. The complexity of this family in plant kingdom may reflect an intensified communication of the plant cell with its environment by perception and transduction of external signals throughout development. In *Arabidopsis*, whole genome sequence has been determined (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000), the RLKs make a large gene family comprising 417 family members with receptor configurations (Shiu and Bleecker 2002). These putative transmembrane receptors are structurally organized into a divergent extracellular domain at N-terminal portion that is thought to confer ligand-binding specificity followed by an internal transmembrane segment and a predicted cytoplasmic signal-transducing domain that includes a juxtamembrane domain, a conserved serine/threonine kinase domain, and a C-terminal region. On basis of their extracellular domain, these receptors have been organized into different structural classes.

The RLK subfamily with extracytoplasmic leucine-rich repeats (LRR) represents the largest class of putative receptor-encoding genes in the *Arabidopsis* genome (Shiu and Bleecker 2001; Dievart and Clark 2004). They are classified into 13 subfamilies (LRR I-XIII) on the basis of the LRR organization, ranging from three to 26 LRRs. Despite their conceptual relevance in cell signaling events, biological function has been assigned to only a few plant LRR-RLKs, in development and in defense responses. Examples of the developmental LRR-RLK genes include the *Arabidopsis* *ERECTA* and *CLAVATA1* genes that determine floral organ shape and size (Torii et al. 1996; Clark et al. 1997), *HAESA* that regulates floral abscission (Jinn et al. 2000), *SERK1* involved in ovule development and early embryogenesis (Hecht et al. 2001) and *BRI1* and *BAK1* that are involved in brassinosteroid perception and signaling (Li and Chory 1997, Li et al. 2002; Nam and Li

2002). The defense genes are represented by *Xa-21* from *Oryza sativa*, which confers resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Song et al. 1995) and *FLS2* involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin (Gomez-Gomes and Boller 2000). Recently, we demonstrated that a nuclear shuttle protein (NSP) from the tomato-infecting geminiviruses TGMV (*Tomato golden mosaic virus*) and TCrLYV (Tomato crinkle leaf yellows virus) interacts stably with tomato and soybean proteins belonging to the LRR-RLK family and designated as LeNIK (*Lycopersicon esculentum* NSP-Interacting Kinase) and GmNIK (*Glycine max* NIK) (Mariano et al.2004). However, the biological significance of this interaction remains to be elucidated.

Geminiviruses constitute a large group of plant virus whose genome are packed as single-stranded DNA circles in a small, twinned isometric particle and is converted to double-stranded forms in nuclei of differentiated plant cells (Hanley-Bowdoin et al.1999). Members of the genus *Begomovirus*, such as TGMV and TCrLYV, possess two genomic components, DNA-A and DNA-B. The DNA-A has the potential to code for five gene products and is involved in replication, transcriptional activation of viral genes and encapsidation of the viral genome (Elmer et al.1988; Kallender et al. 1988; Sunter at al.1990; Fontes et al. 1992. 1994a; Sunter and Bisaro 1992). The DNA-B component encodes two movement proteins, the nuclear shuttle protein NSP (BV1) and the movement protein MP (BC1), both required for systemic infection (Lazarowitz and Beachy 1999; Gafni and Eperl 2002). NSP facilitates the intracellular trafficking of viral DNA between the nucleus and the cytoplasm, whereas MP potentiates its cell-to-cell movement.

Current models of viral cell-to-cell movement hold that the translocation of plant virus into adjacent uninfected cells occurs via plasmodesmata or viral induced endoplasmatic reticulum (ER)-derived tubules (Lazarowitz and Beachy 1999; Gafni and Epel 2002). From the biochemical activities of MP and NSP from *Squash leaf curl virus* (SLCV) and *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV), it has been proposed that geminiviruses use both mechanisms for cell-to-cell trafficking of viral DNA (Noueiry et al. 1994;

Sanderfoot and Lazarowitz 1996). In the first model, NSP facilitates the intracellular movement of the viral genome from the nucleus to the cytoplasm, where it is replaced by MP that transports the viral DNA to adjacent cells via plasmodesmata (Noueiry et al. 1994). Accordingly, MP from BDMV has been shown to act as a classical movement protein with the capacities to bind viral DNA *in vitro*, to increase plasmodesmal size exclusion limit, and to promote translocation of the viral genome to adjacent cells in microinjection studies (Noueiry et al. 1994; Rojas et al.1998). In the second model, MP facilitates NSP-mediated intracellular transport of viral DNA from the nucleus to the cytoplasm and then mediates the transport of the NSP-DNA complex to adjacent cells via ER-derived tubules induced by the viral infection (Lazarowitz and Beachy 1999). Consistent with this model, MP from the phloem-limited SLCV has been immunolocalized to unique tubules that extend across the walls of developing phloem cells and shown to relocate NSP from the nucleus to the cell periphery (Sanderfoot and Lazarowitz 1995; Sanderfoot et al 1996; Ward et al.1997). In addition, SLCV MP does not bind DNA *in vitro*, whereas NSP does (Pascal et al.1994). The apparent discrepancies between these two models have been explained by the phloem limitation of SLCV, whereas BDMV can also infect non-vascular tissues. However, both models rely on the observation that NSP shuttles viral DNA between the nucleus and the cytoplasm and acts in concert with MP to promote the cell-to-cell spread of viral DNA (Lazarowitz and Beachy1999; Gafni and Epel 2002).

The localization of NSP and its proposed role in cell-to-cell movement of the viral DNA predict that interactions with host factors may occur in both cytoplasm and the nucleus. Thus, the interaction of NSP with transmembrane factors could involve an active recognition in the nuclear pore, plasma membrane or plasmodesmata (Mariano et al. 2004). The recent demonstration that NSP from tomato-infecting geminiviruses associates physically with LRR-RLKs may provide insight into the functions of this complex class of putative transmembrane receptors. In this investigation, we took advantage of the capacity of the geminivirus CaLCuV (*Cabbage leaf curl virus*) to infect

*Arabidopsis* (Hill et al. 1998). In *Arabidopsis* reverse genetic studies are possible (Alonso et al. 2003) to decipher the function of these NSP-interacting putative transmembrane receptors and to determine the biological relevance of the NIK-NSP interaction. We demonstrate that the *Arabidopsis* NSP-interacting LRR-RLKs are authentic protein kinases with biochemical properties of signaling receptors. Binding of NSP to NIK inhibits its kinase activity, and loss of NIK gene function enhances susceptibility to geminivirus infection. Our data suggest that NIKs are involved in antiviral defenses and that NSP potentially counters the proactivation mechanism of this pathway by inhibiting NIK kinase activity.

## METHODS

### *Plasmid constructions*

The GmNIK and LeNIK cDNA orthologs from *Arabidopsis*, *AtNIK1* (U19571), *AtNIK2* (U21612), *AtNIK3* (U10870) and *AtSERK1* (U13033) were obtained from *Arabidopsis* Biological Resource Center. To create plasmids for the two-hybrid analysis, we amplified the NIK1 C-terminal kinase domain (KD, encoding amino acids 298-638) and its truncated versions ( $\Delta$ KD<sup>298-502</sup>,  $\Delta$ KD<sup>417-638</sup>,  $\Delta$ KD<sup>422-502</sup>,  $\Delta$ KD<sup>502-638</sup>) by PCR from U19571 cDNA and cloned into EciRI and SstI sites of pEXAD502 (Invitrogen Life Technologies, Inc.), as GAL4 activation domain fusions. Likewise, intact (KD) and truncated versions ( $\Delta$ KD) of NIK2 (KDNIK2<sup>292-635</sup>,  $\Delta$ KDNIK2<sup>415-635</sup>), NIK3 (KDNIK3<sup>257-632</sup>,  $\Delta$ KDNIK3<sup>406-632</sup>) and AtSERK1 ( $\Delta$ KDSERK1<sup>408-625</sup>) kinase domain as well as an active (KDBRI1) and an inactive mutant (KDBRI1-M) kinase domain of BRI1 were fused in-frame to the GAL4 activation domain in pEXAD502. The NSP coding regions were amplified by PCR from TGMV DNA-B (Fontes et al. 1994b), TCrLYV DNA-B (Galvão et al. 2003), or CaLCuV-B (Hill et al. 1998) with Pfu DNA polymerase

(Stratagene) and cloned into Sall and SstI sites of pBDLeu (Invitrogen Life Technologies, Inc.). The resulting clones pBD-NSPTGMV, pBD-NSPTCrYLC and pBDNSPCLCV, contained the GAL4 DNA-binding domain fused to NSP sequence. All the other recombinant plasmids were obtained through the GATEWAY system (Invitrogen Life Technologies, Inc.). Briefly, the specified DNA fragment were amplified by PCR with appropriate extensions and introduced by recombination into the entry vector pDONR201 and then transferred to the appropriate destination vector. A description of all recombinant plasmids is provided in the supplementary table.

GST-fused NSPs and His-tagged NSPs were generated by transferring TGMV NSP, TCrYLV NSP and CaLCuV NSP coding regions from pDONR201 to the bacterial expression vector pDEST15 (GST fusions) or pDEST17 (His fusions). Likewise, KD and  $\Delta$ KD sequences (as defined earlier) of NIK1, NIK2, NIK3 and AtSERK1 were introduced into pDONR201 and then transferred to pDEST15, resulting in GST fused to active domain (KD) and to inactive, NBS-deleted kinase domain ( $\Delta$ KD). For in vitro transcription and translation of proteins, the NIK1, NIK2, NIK3 and AtSERK1 coding regions and their respective KD and  $\Delta$ KD fragments were transferred from the entry vector to the T7 RNA polymerase-dependent transcription vector pDEST14. NIK1, NIK2 and NIK3 coding regions were also transferred from the entry vector to the binary vector pK7WG2. The resulting constructs, pK7F-NIK1, pK7FNIK2, and pK7FNIK3 contain a GFP gene fused in-frame after the last codon of NIK1, NIK2 and NIK3 cDNAs, respectively, under the control of the CAMV 35S promoter.

### ***Yeast strain and two-hybrid assays***

The yeast two-hybrid assays were performed as described previously (Mariano et al. 2004). Yeast reporter strain MaV203 (*MAT  $\alpha$* , *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3200*, *ade2-101*, *gal4*, *gal80*, *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2*, *can1R*,

*cyh2R*) was cotransformed with BD-NSP fusions and pEXAD502 derivatives. Interactions were monitored by the ability of the reporter strain to grow on media lacking leucine, tryptophan, uracil and histidine, but supplemented with 25 mM 3-aminotriazole. The interactions were further confirmed by measuring  $\beta$ -galactosidase activity from yeast extracts with o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside, as described previously (Uhrig et al.1999).

### ***Purification of His-tagged and GST- fusion proteins***

All recombinant GST-fused proteins and His-tagged proteins were prepared using the expression vectors pDEST15 (GST fusions) and pDEST17 (6X His fusions) (Invitrogen, Life technologies, Inc.). Plasmids containing different fusions were transformed into *E. coli* strain BL21 and the synthesis of the recombinant proteins was induced by 0,5mM isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside for 12 h at 20°C. The GST fusions and His-tagged proteins were affinity-purified using GST-sepharose beads (Pharmacia) and Ni<sup>2+</sup>-Agarose (Qiagen), respectively, according to manufacturer's instructions.

### ***In vitro Protein binding assay***

To express intact and truncated versions of NIK *in vitro*, we used 1  $\mu$ g of recombinant plasmid containing the appropriate insert in pDEST14 (as described earlier) in an *in vitro* transcription and translation system supplemented with [<sup>35</sup>S]-methionine and T7 RNA polymerase (Promega). The <sup>35</sup>S-labeled proteins were incubated for 1 h at 4°C with 50  $\mu$ L of glutathione-Sepharose beads to which purified GST or GST-NSP had been adsorbed. The beads were pelleted by centrifugation and washed five times with 1 mL of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40. Bound proteins

were resolved by SDS/PAGE on an 8-20% polyacrylamide gel, and visualized by fluorography.

### ***Fluorescence microscopy***

Fluorescence deconvolution microscopy was conducted on a Delta Viosion restoration microscope system (Applied Precision) consisting of an Olympus IX70 inverted microscope. Specific filter was used for GFP (490 ± 10 excitation, 510 ± 5 emission) and NIK-GFP patterns were observed in epidermal cells of Arabidopsis leaves bombarded with pK7FNIK1, pK7FNIK2, and pK7FNIK3. For confocal laser scanning microscopy, stably plant Neofluar 40x objective (NA 0.75 Zeiss Corp.) and a LSM krypton laser as excitation source (excitation of GFP molecules at 488nm). GFP emission was detected by using a 505-530nm filter. Images were assembled with Adobe Photoshop (Adobe Systems).

### ***Protein kinase assay***

Purified GST-KDNIK1, GST-KDNIK2 or GST-KDNIK3 fusion proteins were incubated alone or with GST-ΔKDNIK1, GST-ΔKDNIK3 or GST-ΔKDSERK1 at 25 °C for 30 min in 30 μL of kinase buffer containing 18 mM Hepes (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 10 μM ATP and 5 μCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Phosphoproteins were resolved by SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie brilliant blue to verify protein loading, dried and subjected to autoradiography. Incorporated radioactivity in protein bands was quantified by phosphoimaging.

### ***RT-PCR***

Total RNA from seedlings, leaves, flowers and roots was extracted using an RNaseasy kit (Qiagen). First-strand cDNA was synthesized from 2–5 µg of total RNA using the SuperScript III Kit (Invitrogen Life Technologies, Inc.) according to the manufacturer's instructions. PCR assays were performed with *AtNIK1*-, *AtNIK2*- and *AtNIK3*- specific primers as described (Cascardo et al.2000). PCR was also carried out with actin gene-specific primers to assess the quantity and quality of the cDNA.

### ***CaLCuV inoculation and analysis of infected plants***

*Arabidopsis thaliana* plants at the seven-leaf stage were inoculated with plasmids containing partial tandem repeats of CaLCuV DNA-A and DNA-B by biolistic delivery as described (Schaffer et al.1995). Total nucleic acid was extracted from systemically infected leaves and viral DNA was detected by PCR with DNA-A or DNA-B begomovirus specific primers (Rojas et al.1993) and/or by DNA gel blot analysis (Fontes et al.1994b).

## RESULTS

### *NSP interacts with LeNIK and GmNIK-related proteins from Arabidopsis that belong to the LRRII subfamily of the RLK family*

We demonstrated previously that NSP interacts with the kinase domain of a putative transmembrane receptor from tomato (LeNIK) and soybean (GmNIK) (Mariano et al.2004). The full-length host proteins exhibit a modular organization that resembles members of the Arabidopsis LRRII subfamily of the RLK family (Shiu and Bleeker 2001). Among them, GmNIK is most closely related to At5g16000-encoded product (U19571, 76% sequence identity), followed by At3g25560 (70%) and At1g60800 (61%) whose functions are unknown. The sequence conservation increases to 85% identity if just the kinase domain is used as the basis for comparison. It also shares significant conservation of primary structure with the others members of this family (40%-55% identity). We selected the three GmNIK-most related LRRII-RLKs to evaluate their capacities to interact with NSP from tomato-infecting geminiviruses (TGMV and TCrYLC) and from an Arabidopsis-infecting geminivirus (CaLCuV). Interactions were assessed by the two-hybrid system monitored for histidine and uracil prototrophy. NSPs interacted with both intact (KD) and nucleotide-binding site (NBS)-deleted kinase ( $\Delta$ KD) domains of all tested members of LRRII-RLK subfamily (Table 1). Interactions of two partners were confirmed by monitoring  $\beta$ -galactosidase activity in yeast protein extracts. The NSP interactions were specific to members of the LRRII-RLK subfamily, because NSP did not interact with either an active or an inactive kinase domain of BRI1, a 25 LRR-containing receptor kinase that belongs to the LRR IX subfamily of the RLK family (Shiu and Bleeker 2001; Deivart and Clark 2004) (Fig. 1B). Based on primary sequence conservation as compared to GmNIK and LeNIK as well as their capacity to interact with

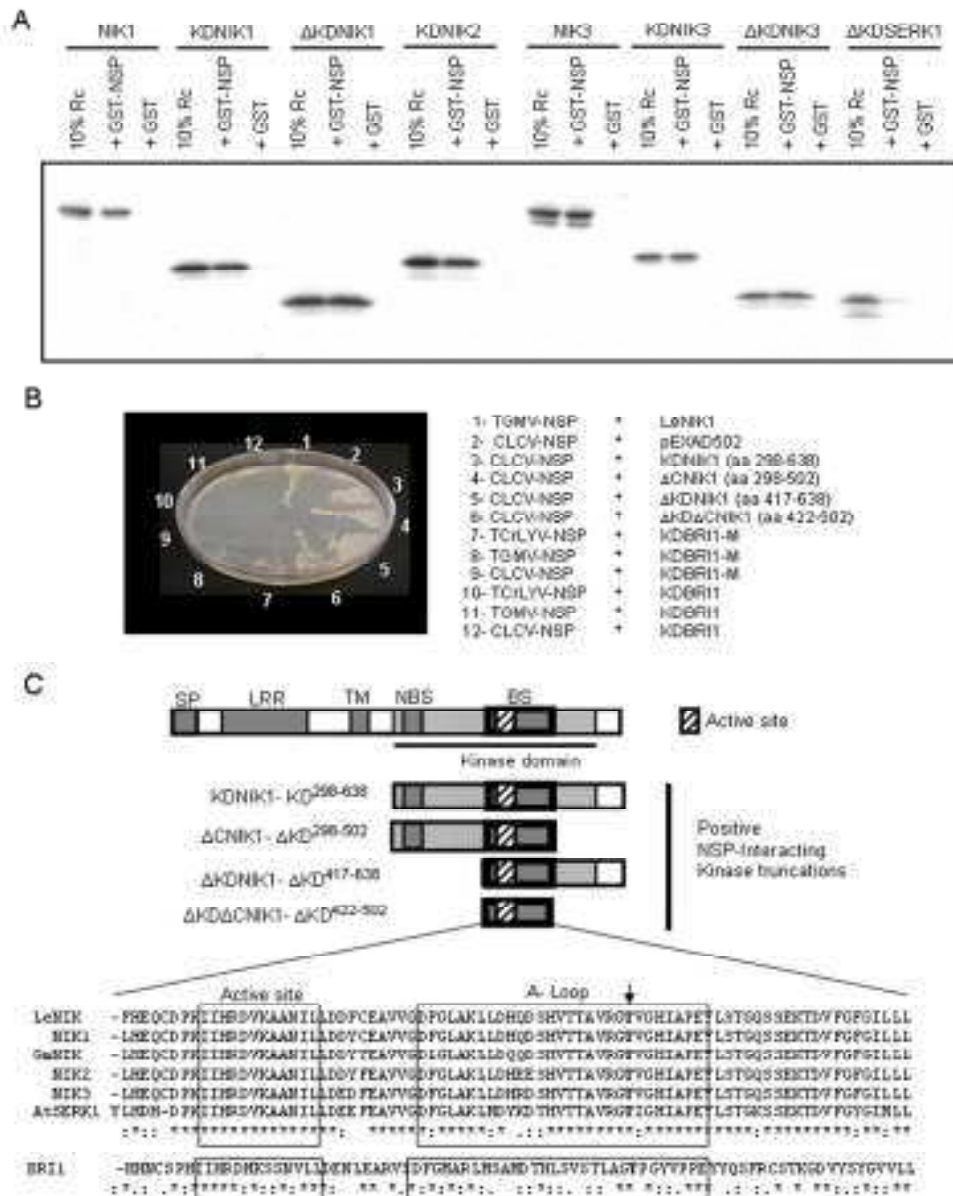
NSP, At5g16000, At3g25560 and At1g60800 are designated here as AtNIK1, AtNIK2 and AtNIK3, respectively. These results validated our previous interpretation that NSP-NIK complex formation was neither virus-specific nor host-specific (Mariano et al.2001).

**Table 1.** Interaction of NSP from *Arabidopsis*- and tomato-infecting geminiviruses with members of the LRRII-RLK family in yeast

BAIT	pDBLeu				pBD-NSPCLCV				pBD-NSPTGMV			
	+H +U	-H +3AT	-U	β-Gal*	+H +U	-H +3AT	-U	β-Gal	+H +U	-H +3AT	-U	β-Gal
pAD-KDNIK1	+	-	-	0.0	+	+	+	0.512± 0.064	+	+	+	0.642± 0.057
pAD-ΔKDNIK1	+	-	-	0.0	+	+	+	0.528± 0.082	+	+	+	0.505± 0.043
pAD-KDNIK2	+	-	-	0.0	+	+	+	0.425± 0.037	+	+	+	0.328± 0.091
pAD-KDNIK3	+	-	-	0.0	+	+	+	0.812± 0.054	+	+	+	0.724± 0.068
pAD-ΔKDNIK3	+	-	-	0.0	+	+	+	0.812± 0.071	+	+	+	0.799± 0.033
pAD- ΔKDSERK1	+	-	-	0.0	+	+	+	0.215± 0.027	+	+	+	0.187± 0.076
pAD-SBP	+	-	-	0.0	+	-	-	0.0	+	-	-	0.0

The bait proteins were expressed as GAL4 DNA binding domain fusions, and the prey proteins were expressed as GAL4 activation domain fusions in yeast. KD corresponds to the C-terminal kinase domain of the protein and ΔKD is NBS-deleted kinase domain. NIK1, NIK2, NIK3 and SERK1 are members of the *Arabidopsis* LRRII-RLK family. SBP is an unrelated sucrose binding protein from soybean used as a control in the two hybrid assays. U, uracile; H, histidine; 3AT, 25 mM 3-aminotriazole; β-Gal, β-Galactosidase activity.

\*Values for activity are the mean ± standard deviation from 4 replicas.



**Figure 1-** Specificity of NSP interaction with LRR-RLKs. (A) *In vitro* interaction of NSP with NIKs. *In vitro*-transcribed and -translated  $^{35}$ S-labeled proteins, as indicated in the figure, were allowed to interact with bacterially expressed GST or GST-NSP linked to glutathione-Sepharose beads. After extensive washing of the beads, the retained proteins were separated by SDS-PAGE and visualized through fluorography. Input contains a sample (10% reaction) of the respective transcription and translation reaction mixtures. (B) NSP does not interact with either active or inactive kinase domain of BRI1, a member of the LRR IX subfamily of the RLK family. Yeast cells expressing the indicated recombinant proteins were plated on selective medium lacking leucine, tryptophan, uracil, histidine, and supplemented with 25 mM 3-AT and grown for 3 days at 30°C. (C) Mapping of NSP binding domain on NIK1. The diagram represents the NIK1 truncated versions that interacted with NSP (B). In the sequence comparison of the NSP binding domain among NSP-interacting kinases and AtSERK1- and BRI1-corresponding regions, the active site and A-loop are boxed and the arrow indicates the conserved threonine residue. (SP) signal peptide; (LRR) leucine-rich repeats; (TM) transmembrane domain; (NBS) nucleotide binding site; (BS) NSP binding site.

### ***Specificity of NSP interaction among members of the LRR-RLK family***

To further confirm the interaction of NSP with NIKs, we performed an *in vitro* protein binding assay (Fig. 1A). Purified GST-NSP or GST was incubated with the *in vitro* translated [<sup>35</sup>S]Met-labeled intact AtNIK1 or AtNIK3, as well as the kinase domain (KD) or the nucleotide binding site NBS-deleted kinase domain ( $\Delta$ KD) of AtNIK1, AtNIK3 and AtSERK1, as indicated in Fig 1A. The resulting complexes were isolated by glutathione-Sepharose beads. Except for  $\Delta$ KD-SERK1, all the other *in vitro* labeled proteins, either as intact or truncated kinases, bound to GST-NSP but not to GST alone, indicating that NSP specifically and stably interacts with AtNIK1, AtNIK2 and AtNIK3, but not with AtSERK1 (Fig. 1A). Although the truncated kinase domain of AtSERK1 ( $\Delta$ KDSERK1) interacted with NSP in yeast, as monitored by His and Ura prototrophy of double transformed yeast cells, quantification of  $\beta$ -galactosidase activity resulted in a weak signal (0.18 and 0.21 units), whereas NSP interaction with KDNIK1, KDNIK2 and KDNIK3 gave higher values (Table I). Collectively, these results suggested that NSP discriminates among the members of the LRR-RLK subfamily. Because NSP interaction with AtSERK1 was weak in yeast and barely detected *in vitro*, AtSERK1 was not considered further.

To determine the region of AtNIK1 responsible for specific interaction with NSP, we fused various truncations of its kinase domain were fused to GAL4 activation domain and assayed them for their interaction with NSP in yeast. These results are shown in Figure 1B, and the kinase deletions that scored positively for histidine and uracil prototrophy are schematized in Figure 1C. The deletion analysis mapped the NSP-interacting domain in NIK1 to an 80 amino acid region of the kinase domain (amino acids 422-502) that encompasses the putative active site for Ser/Thr kinases (sub-domain VIb-HrDvKssNxLLD) and the activation loop (sub-domain VII-DFGak/rx, plus sub-domain VIII-GtxGyiaPEY) (Fig 1C).

***The NIKs are plasma membrane-localized proteins that exhibit biochemical properties consistent with a receptor signaling function***

The NSP-interacting LRR-RLKs possess an internal transmembrane helix and a peptide signal that may target the protein to the secretory apparatus. Consistent with this observation, AtNIK1 fractionated with leaf microsomal preparations composed primarily of endomembrane vesicles and plasma membranes (data not shown). Furthermore, AtNIK1-, AtNIK2- and AtNIK3- fused to green fluorescent protein (GFP) were targeted to the cell surface in transient assays of bombarded young leaves (Fig. 2A). Localization of NIK1-GFP fusions was also analyzed in cauline cells of stably transformed plants through confocal laser scanning microscopy (Fig. 2B). Intense GFP fluorescence was observed in the cell surface delimitating the cell boundaries. Because of the chlorophyll autofluorescent background, chloroplasts were also labeled, although to a lesser extent.

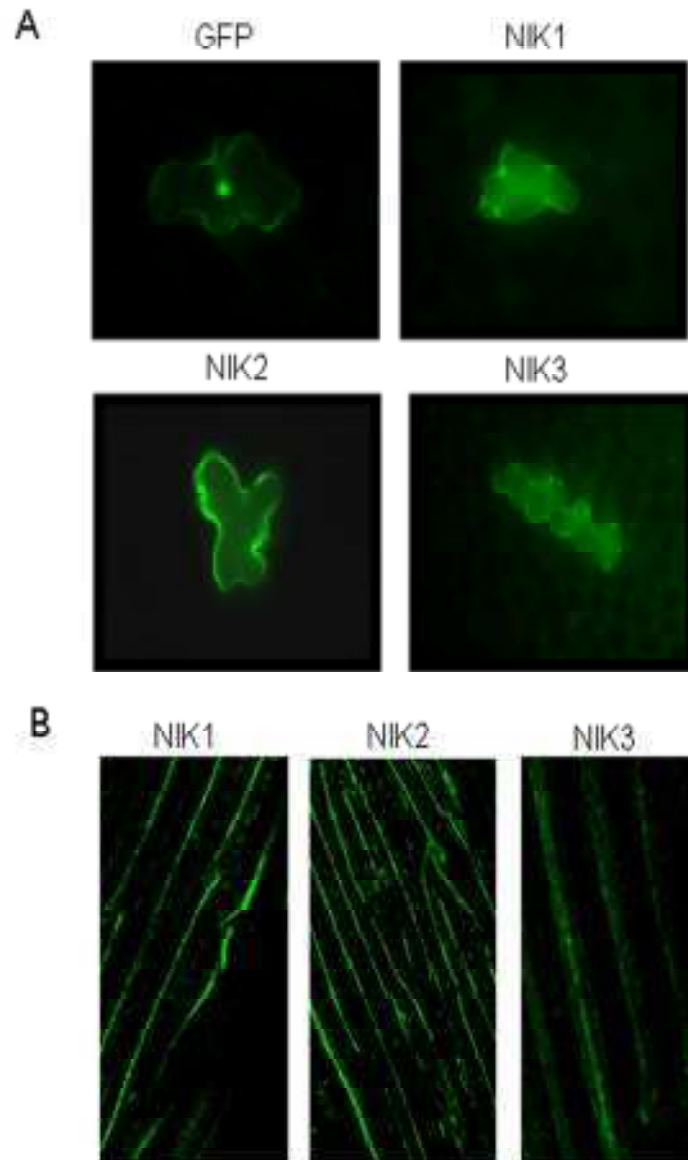
The C-terminal kinase domain of NIKs contains all of the 11 conserved subdomains of protein kinases, in addition to specific signatures of serine/threonine kinases in subdomains V1b and VIII (Hanks et al. 1988; Hanks and Quinn 1991; Taylor et al. 1995). To investigate whether AtNIKs possess kinase activity, we expressed their C-terminal regions containing an intact kinase domain (KD) or a truncated kinase domain ( $\Delta$ KD), in which the critical subdomains I and II were deleted, as GST fusions in *Escherichia coli* and affinity-purified on glutathione-Sepharose. Kinase activity was assayed *in vitro* by incubation of purified recombinant proteins with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP and analysis of  $^{32}$ P incorporation. As shown in Fig. 3A, GST-KDNIK1, GST-KDNIK2 and GST-KDNIK3 undergo autophosphorylation in a  $Mg^{2+}$ - or  $Mn^{2+}$ -dependent manner and no activity was observed with  $CaCl_2$ . In fact, inclusion of  $CaCl_2$  in  $Mg^{2+}$ -based reactions apparently reduced the kinase activity. In contrast, neither GST alone (data not shown) nor the truncated kinase domain fusions (GST- $\Delta$ KDNIK1 and GST- $\Delta$ KDNIK3) exhibited kinase activity (Fig. 3B). GST- $\Delta$ KDSERK1 did not show detectable autophosphorylation, consistent with its lack of the critical Ser/Thr kinase subdomain I and II. These results

provide direct biochemical evidence that AtNIK1, AtNIK2 and AtNIK3 cytoplasmic domains possess a functional kinase activity that requires the presence of typical conserved domains for ser/thr kinases.

In plants, autophosphorylation of ser/thr kinases occurs via either an intra or intermolecular mechanism (Schulze-Muth et al.1996; Roe et al. 1997; Sessa et al. 1998; Shah et al. 2001b). To examine the mechanism of NIKs autophosphorylation, we tested the ability of the GST-fused kinase domains (KD) to phosphorylate inactive, truncated versions of transmembrane kinases ( $\Delta$ KD-NIK1,  $\Delta$ KD-NIK3 and  $\Delta$ KD-SERK1). As shown in Figure 3B, GST-KDNIK1 was able to phosphorylate the inactive  $\Delta$ KD-NIK1 in trans. Transphosphorylation was not restricted to the cognate receptor, as  $\Delta$ KD-NIK3 and  $\Delta$ KD-SERK1 were also phosphorylated by AtNIK1. Likewise, AtNIK2 (Fig 3B) and AtNIK3 (data not shown) could trans-phosphorylate the inactive, truncated kinase domains of the transmembrane receptors. These results indicate that AtNIK autophosphorylation occurs through an intermolecular mechanism. Furthermore, they suggest that AtNIKs phosphorylate exogenous substrate, because AtSERK1, which has been shown to be phosphorylated on serine and threonine residues (Shah et al. 2001b), was efficiently phosphorylated by the kinases.

In the mechanism of transphosphorylation-mediated receptor kinase activation, oligomerization precedes the activation of kinase domain (Lemmon and Schlessinger 1994; Roe et al. 1997). To determine whether oligomerization is involved in regulation of NIK1 kinase activity, we took advantage of the capacity of GST to dimerize and the existence of a properly-located thrombin-cleavage site on the recombinant protein that allows separation of GST from its fusion partner, KDNIK1. The kinase activity of the thrombin-cleaved GST-KDNIK1 was lower than that of intact GST-KDNIK1 (Fig. 3C, left panel). After normalizing to the amount of protein, the difference was fourfold (Fig 3C, bottom panel). Progressive dilution of the recombinant protein into the kinase assay had a much greater impact on the specific kinase activity of the thrombin-cleaved GST-KDNIK1 than on that of intact GST-KDNIK1. Thus, in the absence of the GST dimer,

the specific activity of the cleaved kinase portion was concentration dependent. These results support a mechanism for activation of the kinase domain involving trans-autophosphorylation mediated by oligomerization of the protein.

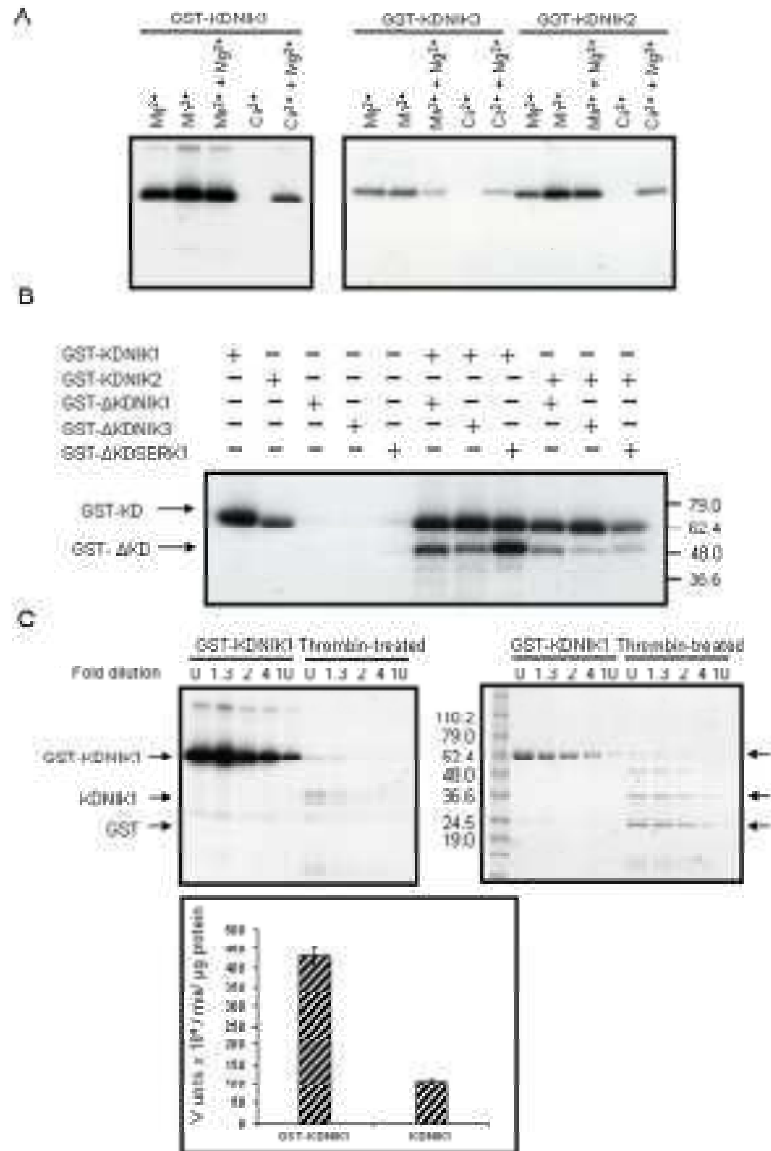


**Figure 2.** NIK1, NIK2 and NIK3 are localized to the plasma membrane. (A) Fluorescence deconvolution microscopy images from epidermal cells of *Arabidopsis* leaves bombarded with *GFP*, *NIK1-GFP*, *NIK2-GFP* and *NIK3-GFP*, under the control of the 35S promoter. (B) Confocal fluorescence images of *Arabidopsis* cauline cells stably transformed with *NIK1-GFP*, *NIK2-GFP* or *NIK3-GFP*.

### ***NSP inhibits AtNIK kinase activity***

Given that NIKs are authentic serine/threonine kinase proteins and that SqLVCV NSP is phosphorylated in infected plants (Pascal et al. 1994), we next examined if the viral NSP is an AtNIK substrate. Neither AtNIK1 nor AtNIK2 phosphorylated GST-NSP from TGMV and CaLCuV (Fig. 4A). In contrast, inclusion of the recombinant viral proteins in the kinase assays inhibited both NIK1 and NIK2 activity. Incorporation of  $^{32}\text{P}$  into GST-NIK1 and GST-NIK2 was reduced six and two-fold, respectively, by either NSP from CaLCuV or TGMV (Fig. 4A, bottom panel). NSP from TCrLYV inhibited the kinase activity of the transmembrane receptors to the same extent as did TGMV-NSP or CaLCuV-NSP (data not shown). Inhibition of AtNIK activity by GST-fused viral proteins was not due to the presence of the GST domain because His-tagged CaLCuV-NSP, which is not able to dimerize with GST-KDNIK1 via the GST tag, also inhibited the kinase activity of AtNIK1 (Fig. 4B). A three-fold molar excess of His-NSP was sufficient to abolish auto-phosphorylation of AtNIK1. The inhibitory activity of His-NSP was higher than that of GST-NSP (Fig. 4C) and this difference may be due to conformational constraints imposed by the GST tag.

Despite the strong conservation of the NSP-binding domain among the members of the LRR-II-RLK subfamily (Fig. 1C), NSP associated weakly with AtSERK1 (Fig. 1A) and did not inhibit its kinase (Fig. 4A). Furthermore, NSP can be phosphorylated *in vitro* by retyculocyte kinases (data not shown) and has also been shown to be phosphorylated *in vivo* (Pascal et al 1994). Together, these observations suggest that the NSP inhibition of NIK is not due to casual interactions of NSP with kinases, and instead reflects an inherent, specific activity of the viral protein.



**Figure 3-** The NSP-interacting kinases exhibit biochemical properties of signaling receptors. (A) NIKs undergo autophosphorylation *in vitro* in a  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$ -dependent reaction. Bacterially produced GST-fusion proteins (as indicated) were purified and aliquots of 200-500 ng were incubated with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  in the presence of the indicated cations. After separation on 4-20% SDS-PAGE, the phosphoproteins were visualized by autoradiography. (B) Autophosphorylation of NIKs occurs intermolecularly. GST-fusion proteins (as indicated) were incubated with  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The migrations of GST-fused kinase domains (GST-KD) and their truncated versions (GST- $\Delta$ KD) are indicated. The positions of molecular markers are indicated on the right in kilodaltons. (C) Oligomerization is required for kinase activation. GST-KDNIK1 was cleaved with thrombin and equal amounts of intact or thrombin-cleaved GST-KDNIK1 were used as serial dilutions in the kinase assay. Phosphorylated proteins were analyzed by Coomassie-stained SDS-PAGE (right) and visualized by autoradiography (left). The migrations of GST-KDNIK and thrombin-cleaved GST-KDNIK1 (GST and KDNIK1) are indicated. Molecular markers are shown in kilodaltons. The plot on the bottom shows the relative kinase activity of GST-KDNIK1 and thrombin-cleaved GST-KDNIK1 expressed as specific activity.

***AtNIK1, AtNIK2 and AtNIK3 exhibit partially overlapping, but distinct expression patterns***

In Arabidopsis, CaLCuV infects leaf tissues with high efficiency, inducing symptoms of severe stunting and leaf epinasty (28). To determine whether the onset of geminivirus infection correlates with *NIK* expression, we analyzed the expression pattern of *AtNIK1*, *AtNIK2* and *AtNIK3* by semi-quantitative RT-PCR with gene-specific primers (Fig. 4A). All RT-PCRs were repeated with different numbers of cycles to ensure a quantitative linear amplification. In addition, the integrity and amount of cDNA from different organs were routinely assessed with actin-specific primers. Both *AtNIK1* and *AtNIK3* transcripts were highly expressed in seedlings and leaves and accumulated to a lower level in roots. In contrast, *AtNIK2* transcripts predominated in roots and were barely detected in seedlings and leaves. The specificity of the primers was confirmed in expression analysis of T-DNA insertion *atnik1*, *atnik2* and *atnik3* alleles (Fig 4B). RT-PCR was performed on leaf (L) and root (R) RNA samples from wild type (*AtNIK1\**, *AtNIK2\** and *AtNIK3\**), *atnik1*, *atnik2* and *atnik3* knockout lines. With the gene-specific primers, we detected no accumulation of the corresponding transcript in the respective homozygous T-DNA insertion mutant, confirming that they are null alleles. A diagram of the locus T-DNA insertions is shown in Fig. 4C.

***AtNIK knockout lines exhibit enhanced susceptibility to geminivirus infection***

To assess directly the biological significance of NIK-NSP interactions, T-DNA insertion *atnik1*, *atnik2* and *atnik3* mutant plants and wild type Col-0 lines were inoculated with CaLCuV DNA-A and DNA-B. Both Col-0 and *atnik1*-KO lines developed typical CaLCuV symptoms of similar intensity. However, removal of coat protein sequences from CaLCuV DNA-A attenuated the virus in Col-0 plants, but not in the *atnik1* null background (Fig. 5A, bottom panels). In this case, disease symptoms

varied in severity from extreme stunting with severe epinasty and chlorosis in *atnik1*-KO to mild stunting with epinasty and moderate chlorosis in Col-O lines. This attenuated form of the virus was used to analyze the course of infection in the Knockout lines. As judged by symptom appearance and viral DNA accumulation, inactivation of *AtNIK1* and *AtNIK3* alleles accelerated the onset of virus infection in comparison to Col-0- and *AtNIK1*\*-infected plants, in which the T-DNA insertion segregated out recovering homozygous *AtNIK1* wild type alleles (Fig. 5C). The infection rate for *atnik1* mutant and *AtNIK1*\* plants correlated with accumulation of viral DNA (Fig. 5B). In addition to be detected earlier in the *nik1* mutant, viral DNA-A and DNA-B accumulated to higher levels in these lines compared to *NIK1*\*. The enhanced susceptibility phenotype was not observed to the same extent in *atnik2* null alleles. The infection rate for *atnik2*-KO was slightly higher than that for Col-0, but still considerably less than those for *atnik1*-KO and *atnik3*-KO (Fig. 5B). These results are consistent with the pattern of *AtNIK1*, *AtNIK2* and *AtNIK3* expression. In repetitive experiments, the infectivity data, expressed as DPI<sup>50%</sup> (days post-inoculation to get 50% of infected plants), confirmed further the null allele phenotypes upon geminivirus infection (Fig. 5D).

## DISCUSSION

A complete knowledge of the size and complexity of LRR-RLK family has emerged with the sequence of the Arabidopsis genome, but functional information is limited to a few family members, that are amenable to genetic approaches. Here we describe the biochemical characterization of new members of this family, identified as virulence targets of the geminivirus NSP. NSP interacted with three members of this family, *AtNIK1*, *AtNIK2* and *AtNIK3*, which were shown to be authentic ser/thr kinases with biochemical properties consistent with a receptor signaling function. NSP inhibited these transmembrane receptor kinases, suggesting their involvement in antiviral defense

response. This interpretation was corroborated by infectivity showing a positive correlation between infection rate and inactivation of *AtNIK1* and *AtNIK3* gene expression. Furthermore, the failure of *AtNIK2* null alleles to exhibit an enhanced susceptibility phenotype strengthened the argument that suppression of NIK-mediated defenses is NSP-dependent, because the expression pattern of *AtNIK2* is not spatially coordinated with the onset of CaLCuV infection and, hence, with NSP accumulation.

Based on primary structural analysis, *AtNIK1*, *AtNIK2* and *AtNIK3* are classified as LRR-RLKs and, thus, predicted to be transmembrane serine/threonine receptor kinases. We demonstrated that the NIK proteins exhibit a series of biochemical properties characteristic of authentic ser/thr kinase receptors that mediate signal transduction through membranes. First, the NIK proteins were localized in plasma membrane. Second, we have shown that their cytoplasmic domain has a functional kinase domain with autophosphorylation properties. Deletion of the conserved ser/thr kinase subdomains I and II abolished autophosphorylation of GST-fusion NIK protein, confirming that incorporation of  $^{32}\text{P}$  into the fusion protein is due to an intrinsic kinase activity and not to a contaminating protein. Third, the NIK kinase domain was able to phosphorylate exogenous substrates. In fact, we showed that *AtSERK1*, which has been demonstrated to be phosphorylated in serine/threonine residues (39), is substrate for NIK. Finally, the molecular features of *AtNIK* autophosphorylation described here provided insight into the likely mechanism of NIK receptor action. The phosphorylation of inactive, deleted-kinase domain by the cognate receptor demonstrated that autophosphorylation occurs via an intermolecular reaction. This transphosphorylation mechanism was further supported by the finding that the autophosphorylation reaction exhibited second order kinetics (Fig. 3C). Intermolecular autophosphorylation is consistent with a receptor signaling mechanism in which ligand-mediated oligomerization is required for kinase activation. Consistent with this mechanism, removal of the GST tag, which functions as an extra dimerizing component, from the recombinant NIK protein reduced its kinase activity by 4-fold. It is likely that oligomerization of NIK

precedes activation of the cytoplasmic kinase domain that is mediated by a transphosphorylation event. Dimerization and intermolecular autophosphorylation is a well documented mechanism for mammalian receptors with tyrosine kinase activity (40) and, more recently, has been shown to dictate LRR-RLK action in plants (39).

We demonstrated that NSP effectively inhibits autophosphorylation of NIK receptors. This result favors the argument that NSP potentially counters the pro-activation mechanism of a NIK-mediated signaling pathway. Accordingly, the NSP-interaction domain was mapped on AtNIK1 to an 80-amino acid stretch containing the putative active site and the activation loop for ser/thr kinases (Fig. 1C). The A-loop plays a critical role in controlling the activity of protein kinases as well as in substrate recognition (41), and its phosphorylation constitutes a key regulatory mechanism that increases the kinase catalytic activity (42). Intermolecular autophosphorylation of a conserved Threonine<sup>468</sup> residue in the A-loop of AtSERK1 is required for kinase activation (39). Given the remarkable conservation of this essential threonine in the A-loop of all LRR-II-RLKs (Fig. 1C), it is likely that AtNIKs use a similar regulatory mechanism for kinase activation. Based on the localization of the NSP-interacting domain on AtNIK1, an attractive molecular mechanism for NSP inhibition of AtNIKs would be that NSP binding-induced conformational or steric constraints impair intermolecular phosphorylation of the NIK A-loop and hence kinase activation.

Although we have not been able to detect direct interaction of NIK and NSP in infected plants, as both proteins are expressed to extremely low levels, an *in vivo* functional link between these proteins has been provided by infectivity assays in loss-of-function mutants. *atnik1* and *atnik3* mutant plants displayed enhanced susceptibility phenotypes upon geminivirus infection, whereas *atnik2* mutants were similar to Col-0, with comparable infection rates. These results implicated AtNIK1 and AtNIK3 as components of antiviral defenses, whereas AtNIK2 might not respond as effectively to geminivirus infection. Although we have shown that *in vitro* NSP binding activity is a shared property of all three transmembrane receptors, *AtNIK2* are barely detected in

leaves where the process of infection takes place with high efficiency (Hill et al., 1998). In contrast, *AtNIK1* and *AtNIK3* are highly expressed in leaves, indicating that opportunistically they are capable to elicit effectively defense strategies against geminivirus infection. Except for NSP that has been demonstrated to target and inhibit these transmembrane kinases specifically, none of the others viral-encoded proteins were found to interact with these transmembrane kinases in yeast (11). Collectively, these results support the argument that the geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress NIK-mediated defenses.

Mutant alleles of *atnik1* and *atnik3* displayed an enhanced susceptibility phenotype upon geminivirus infection, implicating these transmembrane receptors in host defense responses against geminivirus infection. A question that remains unanswered is how NIK-mediated responses act to impair viral infectivity and how NSP interaction would fit in this mechanism. Although NSP-NIK interaction exhibited some properties consistent with the guard hypothesis of plant resistance, our infection results are inconsistent with this possibility (43). According to the elicitor-receptor model of resistance, NSP would function as a virulence factor by binding to the transmembrane receptor NIK and preventing its interaction with a putative R protein, thereby inducing a resistance response. This model also predicts that in the absence of its putative R protein partner, suppression of *NIK* expression in these susceptible lines would not affect the efficiency of geminivirus infection. However, both T-DNA insertion *atnik1* and *atnik3* null alleles were isolated in the susceptible Col-0 genetic background and, in contrast to the guard hypothesis for NIK function, they exhibited enhanced infection rates. More likely, the transmembrane receptor NIK functions as an upstream signaling component of an alternative innate antiviral host defense to impact virus replication or movement negatively. Enhanced efficiency of viral DNA replication or cell-to cell movement in *atnik1* and *atnik3* mutants would account for the increased infection rates and viral DNA accumulation in these lines. The action of NSP would potentially counter these NIK-mediated defense responses to geminivirus infection by inhibiting autophosphorylation of

NIK and receptor kinase activation. According to this model, NSP binding to the kinase domain of NIK prevents activation of a NIK-mediated signaling pathway, creating an intracellular environment that is more favorable to virus proliferation and spread.

Recently, the geminivirus TraP (transactivator protein) has been shown to interact with and inactivate ADK and SNF1 kinases (44, 45). Both SNF1 and ADK have been proposed to be components of innate antiviral defenses and inactivation of these kinases by TraP appears to be a counterdefensive measure. The finding here that NSP also targets and inhibits transmembrane kinases indicates that geminivirus may effectively adopt a broad-spectrum cellular kinase inhibition-based strategy for countering antiviral defenses. This raises the question as to whether these viral proteins act synergistically to suppress integrated defense pathways or additively to inactivate multiple antiviral defenses. The answer of this question will be addressed in future studies on the signal transduction cascades employed by AtNIKs. The discovery that AtNIKs mediate a defense response to geminivirus infection associated with the consequent loss-of-function phenotypes makes AtNIKs-integrated signaling pathway more amenable to genetic characterization. This can functionally compliment biochemical approaches to the isolation of interactive proteins and downstream components. These studies also suggest that the NSP-NIK interaction may be molecular target for the development of a broad-spectrum resistance strategy against geminivirus infection.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Dr. Linda Hanley-Bowdoin for critically reading the manuscript. We thank Drs Tim Petty for providing the CaLCuV DNA-A and DNA-B and Joe Ecker for the T-DNA insertion mutants. This research was supported by the Brazilian Government Agency, CNPq Grant 471606/2003-0 (to E.P.B.F.). A.A.S., D.F.L. and A.J.W. were supported by CNPq graduate fellowships. E.P.B.F. was a recipient of a CAPES senior

research fellowship from the Brazilian Government. J.C. is an Investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

## REFERENCES

1. Shiu, S.H. & Bleecker, A.B. (2001) *Proc Nat Acad Sci USA* **98**, 10763-10768.
2. Dievart, A. & Clark, S.E. (2004) *Development* **131**, 251-261.
3. Clark, S.E., Williams, R.W. & Meyerowitz, E.M. (1997) *Cell* **89**, 575-585.
4. Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi T, Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R. F. & Komeda, Y. (1996) *Plant Cell* **8**, 735-746.
5. Hecht, V., Vielle-Calzada, J.P., Hartog, M.V., Schmidt, E.D.L., Boutilier, K., Grossniklaus, U, & de Vries, S.C. (2001) *Plant Physiol.* **127**, 803-816.
6. Li, J.M. & Chory, J. (1997) *Cell* **90**, 929-938.
7. Nam, K.H. & Jianming Li, J. (2002) *Cell* **110**, 203-212.
8. Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Frans E. Tax, F.E. & Walker, J.C. *Cell* **110**, 213-222.
9. Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner. J., Wang, B., Zhal, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C. & Ronald, C. (1995). *Science* **270**, 1804-1806.
10. Galvão, R.M., Mariano, A.C., Luz, D.F., Alfenas, P.F., Andrade, E.C., Zerbini, F.M., Almeida, M.R. & Fontes, E.P.B. (2003) *J. Gen. Virol.* 2003 **84**, 715-726.
11. 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. (2004) *Virology* **318**, 24-31.
12. Hanley-Bowdoin, L., Settlaga, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S. and Robertson, D. (1999). *Critical. Rev. Plant Sci.* **1**, 71-106.

13. Kallender, H., Petty, I.T.D., Stein, V.E., Panico, M., Blench, I.P., Etienne, A.T., Morris, H.R., Coutts, R.H.A. & Buck, K.W. (1988) *J. Gen. Virol.* **69**, 1351-1357.
14. Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W., Bisaro, D.M. & Rogers, S.G. (1988) *Nucleic Acids Research* **16**, 7043-7060.
15. Fontes, E.P.B., Luckow, V.A. & Hanley-Bowdoin, L. (1992) *Plant Cell* **4**, 597-608.
16. Fontes, E.P.B., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A. & Hanley-Bowdoin, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8459-8465.
17. Sunter, G. & Bisaro, D.M. (1992) *Plant Cell* **4**, 1321-1331.
18. Sunter, G., Hartitz, M.D., Hormudzi, S.G., Brough, C.L. & Bisaro, D.M. (1990) *Virology* **179**, 69-77.
19. Lazarowitz, S.G. & Beachy, R.N. (1999) *Plant Cell* **11**, 535-548.
20. Gafni, Y. & Epel, B.L. (2002) *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **60**, 231-241.
21. Noueir, A.D., Lucas W. J. & Gilbertson, R.L. (1994) *Cell* **76**, 925-932.
22. Sanderfoot, A.A. & Lazarowitz, S.G. (1996) *Trends in Cell Biololgy* **6**, 353-358.
23. Rojas, M.R., Noueir, A.O., Lucas W.J. & Gilbertson R.L. (1998) *Cell* **95**, 105-113.
24. Sanderfoot, A.A. & Lazarowits, S.G. (1995) *Plant Cell* **7**, 1185-1194.
25. Sanderfoot, A.A., Ingham, D.J. & Lazarowits, S.G. (1996) *Plant Physiol.* **110**, 23-33.
26. Ward, B.M., Medville, E., Lazarowitz, S.G. & Turgeon, R. (1997) *J. Virology* **71**, 3726-3733.
27. Pascal, E., Sanderfoot, A.A., Ward, B. M., Medville, R., Turgeon R. & Lazarowitz S.G. (1994) *Plant Cell* **6**, 995-1006
28. Hill, J.E., Strandberg, J.O., Hiebert, E. & Lazarowitz, S.G. (1998) *Virology* **250**, 283-292.
29. Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., et al. (2003) *Science* **301**, 653-657
30. Fontes, E. P. B., Gladfelter, H. J., Schaffer, R. L., Petty, I. T. D. & Hanley-Bowdoin, L. (1994) *Plant Cell* **6**, 405-416.

31. Uhrig, J. F., Soellick, T.-R., Minke, C. J., Philipp, C., Kellmann, J. -W. & Schreier P. H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **96**, 55-60.
32. Cascardo, J. C. M., Almeida, R. S., Buzeli, R. A. A., Carolino, S. M. B., Otoni, W. C. & Fontes, E. P. B. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 14494-14500.
33. Schaffer, R. L., Miller, C. G. & Petty, I. T. D. (1995) *Virology* **214**, 330–338.
34. Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russel, D. R. & Maxwell, D. P. (1993). *Plant Dis* **77**, 340–347.
35. Hanks, S.K. & Quinn, A.M. (1991) *Methods Enzymol.* **200**, 38-62.
36. Schulze-Muth, P., Irmeler, S., Schroder, G. & Schroder, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26684–26689.
37. Roe, J. L., Durfee, T., Zupan, J. R., Repetti, P. P., McLean, B. G., & Zambryski, P. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5838–5845.
38. Sessa, G., D'Ascenzo, M., Loh, Y.-T. & Martin, G.B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15860-15865.
39. Shah, K., Vervoort, J. & de Vries, S. C. (2001) *J. Biol. Chem* **276**, 41263-41269.
40. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 459–463.
41. Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., Roth, R.A., & Rutter, W.J. (1986) *Cell* **45**, 721-732.
42. Hubbard, S. R. & Till, J.H. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 373-398.
43. Van der Biezen, E. A. & Jones, J. D. G. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 454-456.
44. Hao, L. Wang, H., Sunter, G. & Bisaro, D.M. (2003) *Plant Cell* **15**, 1034-1048.
45. Wang, H., Hao, L., Shung, C.-Y., Sunter, G., & Bisaro, D.M. (2003) *Plant Cell* **15**, 3020–3032.

## **CAPÍTULO II**

### **SÍTIOS CONSERVADOS DE FOSFORILAÇÃO NA ALÇA DE ATIVAÇÃO DE NIK1 APRESENTAM FUNÇÕES DISTINTAS NA SINALIZAÇÃO E SÃO INIBIDOS PELA PROTEÍNA NSP DE GEMINIVÍRUS**

Anésia A. Santos, Carolina da Silva Rocha, Lilian Hasegawa Florentino, Eliciane C. Mattos e Elizabeth P.B. Fontes

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - BIOGRO - Universidade Federal de Viçosa - 36571.000 – Viçosa- MG - Brasil

Palavras-chave: receptor cinase, nuclear shuttle protein, geminivírus, serina/treonina cinase, transdução de sinais, resposta de defesa.

## RESUMO

A proteína NIK1 é uma serina/treonina cinase pertencente à subfamília LRR-RLK (receptores do tipo cinase contendo repetições ricas em leucina) de *Arabidopsis* que exibe propriedades bioquímicas consistentes com função de sinalização. NIK foi inicialmente identificada pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivírus, cuja associação, através de uma região que compreende o sítio ativo e a alça de ativação de NIK, inibe a atividade de cinase, suprimindo a provável via de resposta anti-viral mediada pelo receptor. Com a finalidade de elucidar os mecanismos bioquímicos de ativação da proteína NIK1, prováveis sítios de fosforilação conservados na alça de ativação foram mutados e regiões ricas em serinas no C-terminal foram deletadas. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* e avaliadas quanto à capacidade de sofrer autofosforilação e promover fosforilação de um substrato endógeno, previamente identificado por nossa equipe, a proteína L-10. Os resultados mostraram a identificação de um padrão complexo de sítios de fosforilação na alça de ativação de NIK1, que atuam independentemente na trans-autofosforilação e na fosforilação do substrato. Estes resultados indicam que a autofosforilação do resíduo de treonina na posição 474 tem papel crucial na ativação da proteína, que é controlada conjuntamente com a autofosforilação do resíduo de treonina 468. A fosforilação do resíduo de treonina 469 não causou impacto acentuado na atividade de autofosforilação da cinase, mas inibiu a fosforilação do substrato, uma vez que a substituição desse resíduo por uma alanina aliviou a repressão e aumentou a atividade de fosforilação do substrato na ordem de 3 vezes. Similarmente, fosforilação do resíduo de serina localizado na posição 465 regula negativamente a capacidade de fosforilação do substrato. A introdução de NSP nas reações de autofosforilação de NIK1 revelou que NSP atua efetivamente inibindo a atividade de NIK se os resíduos de treonina 474 e 468 permanecem intactos. Além disso, a introdução de uma carga negativa permanente na posição 474, por meio do ácido aspártico suprime a atividade inibidora de NSP. Estes resultados são consistentes com um modelo no qual NSP interage com a alça de ativação de NIK e previne a fosforilação dos resíduos de ativação treonina 474 e 468. Experimentos adicionais em *A. thaliana* transformada com um mutante funcionalmente nulo para a atividade enzimática reforçaram hipótese de que a proteína NIK1 medeia uma resposta de defesa anti-viral por meio de sinalização através de seu domínio de cinase.

## INTRODUÇÃO

A percepção de sinais através de receptores da superfície celular é um mecanismo comum entre os organismos vivos. Proteínas cinases (PK) possuem um papel fundamental em uma grande variedade de processos celulares, resultando em crescimento e desenvolvimento em plantas e animais. Todas as proteínas cinases catalisam a mesma reação química: fosforilação de uma ou mais proteínas ditas como substrato através da transferência do grupamento  $\gamma$ -fosfato do ATP para um grupamento hidroxila na proteína substrato. Em muitos casos, esta função é realizada por receptores cinases (RPK), os quais são divididos em duas grandes classes apresentando diferentes especificidades em seus domínios cinases: receptores tirosina-cinases (RTK) que fosforilam proteínas em resíduos específicos de tirosina, e receptores serina/treonina-cinases (STKR) que fosforilam serinas ou treoninas ou, em alguns casos, ambos os resíduos de aminoácidos (Lin *et al.*, 1992). Células vegetais e animais utilizam-se de receptores cinases para interagir entre si e com o meio extracelular, porém ocorre a dominância de RTK's em animais, enquanto que em plantas STKR's são predominantes. Estas duas grandes famílias apresentam uma origem comum anterior à diversificação dos organismos vivos em animais e plantas (Shiu e Bleecker, 2001a).

O genoma de *Arabidopsis* contém 417 seqüências de proteínas contendo a estrutura típica de um receptor cinase (RLK) que contém um domínio extracelular seguido de um domínio transmembrana e do domínio cinase (Shiu e Bleecker, 2001a). Estas proteínas estão envolvidas em uma grande variedade de processos celulares, como a sinalização de brassinosteróides através das proteínas BRI1 and BAK1 (Li *et al.*, 2002), regulação da abscisão por HAESA (Jinn *et al.*, 2000), controle do desenvolvimento meristemático por CLV1 (Trotochaud *et al.*, 1999) e embriogênese por proteínas SERK (Hecht *et al.*, 2001). Além dessas, destacam-se ainda BONZAI, responsável pela capacidade de crescimento em diferentes condições de temperatura (Belkhadir *et al.*, 2004), ERECTA e CLAVATA1, responsáveis por determinar a forma e o tamanho do órgão floral (Torii *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1997) e proteínas de defesa contra patógenos como RPS2 e RPM1 (Katagiri, 2004) e Xa-21 (Song *et al.*, 1995).

Em *Arabidopsis*, mais da metade das RLK's contém de 1 a 32 repetições ricas em leucina (*Leucine-Rich Repeat* - LRR) em seu domínio extracelular (Shiu e Bleecker, 2001b), tornando-se assim o motivo extracelular mais comumente encontrado (Morris e

Walker, 2003 e Deivart and Clark 2004) e que está envolvido em interações proteína-proteína (Kobe e Deisenhofer, 1994). Membros desta sub-família divergem na organização e na identidade de seqüência de seu domínio extracelular sendo assim categorizados em 13 subfamílias (LRR I-LRR XIII).

Análise de cristalografia do inibidor de ribonuclease de suíno (RI) demonstrou que cada repetição rica em leucina (-LRR) apresenta folhas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélices arranjadas em paralelo a um eixo comum, formando uma estrutura em forma de ferradura, que propicia um sítio de ancoragem para a interação proteína-proteína (Kobe e Deisenhofer, 1995). O domínio LRR dos receptores cinases compreendem, geralmente, 20-29 resíduos de aminoácidos encerrando um segmento de 11 resíduos conservados com seqüência  $LxxLxLxx^N/CXI$  (onde x corresponde a qualquer aminoácido e posições L podem também ser ocupadas por valina, isoleucina e fenilalanina) (Kobe e Kajava, 2004).

A subfamília LRRII-RLK é constituída por 14 proteínas caracterizadas por possuir no domínio extracelular cinco repetições ricas em leucina arranjadas em um único bloco contínuo das quais quatro são ditas completas, possuindo 24 resíduos de aminoácidos e a quinta repetição apresentando 16 resíduos de aminoácidos (Zhang *et al.*, 2006). Estas repetições apresentam seqüência consenso LRR em que L e I presente nas posições 1, 4, 6, 11, 15, 19 e 22 são, muitas vezes, substituídas uma pela outra ou por aminoácidos alifático (A, V, F ou M), enquanto os aminoácidos glicina na posição 13 e prolina na posição 16 da LRR são invariáveis. Além disso, as proteínas LRRII-RLK possuem em comum o número de íntrons, geralmente igual a dez, com exceção da proteína NIK1 (At5g16000) e do gene At5g10290, que perderam íntrons e do gene At5g63637, que além da perda do íntron 4 possui um íntron adicional na região N-terminal. Baseado na conservação dessas características estruturais evolucionárias e em análises filogenéticas foi proposto que as proteínas LRRII-RLK são homólogas e surgiram a partir de sucessivas duplicações de um domínio LRR pré-existente, podendo ser atualmente divididas em três grupos funcionais: I) defesa antiviral; II) desenvolvimento e III) função desconhecida. As proteínas NIK1 (At5g16000), NIK2 (At3g25560) e NIK3 (At1g60800) estão inseridas no grupo I da subfamília LRRII-RLK (Zhang *et al.*, 2006) e foram inicialmente identificadas como alvos de virulência da proteína NSP de geminivírus (Fontes *et al.*, 2004). A interação de NSP com NIK parece ser conservada entre geminivírus e hospedeiros, uma vez que tem sido demonstrado que os homólogos desses receptores de membrana de tomate (LeNIK-*Lycopersicon esculentum* NSP-interacting kinase) e soja (GmNIK-*Glycine max* NIK) interagem estavelmente “in vitro” com a proteína NSP dos geminivírus TGMV (*Tomato golden*

*mosaic virus*) e TCrLYV (*Tomato crinkle leaf yellows virus*), que infectam tomateiros (Mariano *et al.*, 2004).

Os geminivírus constituem um grande grupo de vírus de plantas, cujo genoma é empacotado na forma de DNA circular de fita simples em partículas icosaédricas geminadas e é convertido em uma forma de fita dupla no núcleo de células diferenciadas de plantas. A maioria dos membros do gênero *Begomovirus*, possuem dois componentes genômicos, DNA-A e DNA-B. O DNA-A apresenta o potencial para codificar cinco produtos gênicos (AV1 ou CP, AC1 ou Rep, AC2 ou TrAP, AC3 ou Ren e AC4) e está envolvido na replicação, ativação transcricional de genes virais e encapsidação do genoma viral (Elmer *et al.*, 1988; Sunter *et al.*, 1990; Fontes *et al.*, 1992 e Fontes *et al.*, 1994). O DNA-B codifica duas proteínas de movimento, “*Movement Protein*” (MP ou BC1) e “*Nuclear Shuttle Protein*” (NSP ou BV1), que agem de forma cooperativa resultando no transporte do DNA viral intra e intercelularmente (Lazarowitz and Beachy, 1999). Ambas as proteínas de movimento são requeridas para o estabelecimento de uma infecção sistêmica. NSP transporta o DNA viral entre o núcleo e o citoplasma e então atua cooperativamente com MP para transportar o DNA viral de célula-a-célula através da parede celular.

A proteína de movimento NSP interage com o DNA viral fita simples com alta afinidade, facilitando o seu transporte do núcleo para o citoplasma. NSP possui dois sinais de localização nuclear (NLS) entre os 100 primeiros resíduos de aminoácidos (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996) e um sinal de exportação nuclear entre os resíduos de aminoácidos de 177 a 199, cuja região central é rica em Leucina (LEDKTLIDLH) (Lazarowitz *et al.*, 1999). Essa seqüência é essencial para a exportação nuclear, conforme demonstrado por meio de experimentos em protoplastos de tabaco, e para a infectividade de *Squash leaf curl virus* (SqLCV) (Lazarowitz *et al.*, 1999).

Recentemente foi demonstrado que a proteína NSP de CaLCuV atua como fator de virulência, suprimindo a atividade de cinase de receptores transmembrana de *Arabidopsis* pertencentes à subfamília LRR-RLK. NSP interage especificamente com três membros dessa subfamília, denominados NIK1 (NSP-*Interacting Kinase*), NIK2 e NIK3 através de uma região de 81 resíduos de aminoácidos que compreende o sítio ativo e a alça de ativação (alça-A) de cinases do tipo serina/treonina (Fontes *et al.*, 2004). A alça-A exerce um papel fundamental no controle da atividade dessas cinases por meio da fosforilação de resíduos de treonina conservados nesse domínio (Ellis *et al.*, 1986). Além do fato de NSP inibir a atividade de cinase de NIK, a inativação dos genes *NIK* em

*Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade a infecção por CaLCuV, sugerindo que NIK está envolvida em respostas de defesa anti-viral (Fontes et al., 2004). Nesta investigação, procedeu-se a uma caracterização bioquímica adicional do domínio cinase de NIK, com a finalidade de elucidar os mecanismos de ativação do receptor e de inibição pela proteína NSP. Ainda, ensaios de complementação com domínios cinase intacto e inativo foram conduzidos para comprovar que, de fato, o domínio cinase de NIK sinaliza uma resposta de defesa anti-viral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Construção de DNA, expressão e purificação de proteínas recombinantes*

O plasmídeo recombinante pDON-AtNIK1 (Fontes et al., 2004), contendo o cDNA de NIK1 no vetor de entrada pDONR201 do sistema GATEWAY (Invitrogen Inc.), foi utilizado como molde em reações de PCR para obtenção de mutações dirigidas “in situ”. Resumidamente, os fragmentos específicos de DNA foram amplificados repetidamente por PCR (“*Polimerase Chain Reaction*”) com oligonucleotídeos específicos parcialmente sobrepostos com substituições de nucleotídeos em posições específicas a fim de produzir substituições de resíduos de treonina 474 para alanina, ácido aspártico e ácido glutâmico, da treonina 468 ou 469 para alanina e da serina 465 para alanina. Além disso, foram desenhados oligonucleotídeos para obtenção de versões truncadas na região C-terminal da proteína NIK. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados são apresentadas na Tabela 1 (Anexos). Os plasmídeos obtidos foram utilizados na transformação de *E. coli* estirpe DH5 $\alpha$  por choque térmico, a seleção dos transformantes foi realizada em placas de petri contendo meio LB sólido com canamicina. Os transformantes foram confirmados por PCR (Sambrook et al, 1989), com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene e as mutações analisadas por sequenciamento. Os clones resultantes pDON-NIK1T474A (pUFV669), pDON-NIK1T474D (pUFV613), pDON-NIK1T474E (pUFV614), pDON-NIK1G473V/T474A (pUFV612), pDON-NIK1T469A (pUFV705), pDON-NIK1T468A/T469A (pUFV706), pDON-NIK1T474A/T468A (pUFV716), pDON-NIK1T474A/T469A (pUFV729), pDON-NIK1T474A/S465A (pUFV715), pDON-NIK1 <sup>$\Delta$ 603-638</sup> (pUFV627) e pDON-NIK1 <sup>$\Delta$ 584-638</sup> (pUFV611), tiveram seu DNA extraído e utilizado como molde em reações de amplificação com os oligonucleotídeos NBSAtNIK1F-GA (3848) e KDAAtNIK1RG (primer 3315) Tabela 1, para as versões mutadas e os oligonucleotídeos (3848 e NIK1St1810Rvs-Ga ou 3848 e NIK1St1762Rvs-Ga) para as versões truncadas. Os produtos destas reações foram reamplificados com os oligonucleotídeos AttB1 (2942) e AttB2 (2943) e clonados por recombinação no vetor de entrada pDONR201, de acordo com as especificações do fabricante. Os clones resultantes continham o domínio cinase de NIK1 em suas versões mutadas e truncadas e foram utilizados para transferir os respectivos fragmentos para o vetor de expressão pDEST15, gerando os clones pGST-KDNIK1T474A (pUFV680), pGST-KDNIK1T474D (pUFV622), pGST-KDNIK1T474E (pUFV623), pGST-KDNIK1G473V/T474A (pUFV621), pGST-KDNIK1T469A (pUFV708), pGST-KDNIK1T468A/T469A (pUFV709), pGST-KDNIK1T474A/T468A

(pUFV728), pGST-KDNIK1T474A/T469A, pGST-KDNIK1T474A/S465A (pUFV738), pGST-KDNIK1<sup>Δ603-638</sup> (pUFV656), pGST-NIK1<sup>Δ584-638</sup> (pUFV655) e pGST-L10 (pUFV730).

O cDNA do mutante duplo NIK1G473V/T474A foi também transferido do vetor de entrada para os vetores de transformação de plantas pK7WG2 (LB-[Tnos-KanR-Pnos]-[T35S-(attR2,GW,attR1)-P35S]-RB) e pK7FWG2, resultando nos clones pK7-NIK1G473VT474A (pUFV642) e pK7F-NIK1G473VT474A (pUFV636). O primeiro clone contém o cDNA duplo mutante de NIK1 sob o controle do promotor CaMV 35S, enquanto que no segundo o cDNA mutante de NIK1 está fusionado a GFP.

### ***Purificação de proteínas fusionadas a GST***

Células competentes de *Escherichia coli*, estirpe BL21::DE3 pLysS, foram transformadas com os plasmídeos de expressão pDEST15 contendo as versões mutadas e truncadas do domínio cinase de NIK1, o cDNA de NSP e o cDNA de L10, por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). A seleção foi realizada por plaqueamento em meio de cultura LB sólido ampicilina (100 mg.L<sup>-1</sup>). Os transformantes foram confirmados por PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse e para o vetor. Os transformantes foram crescidos em 1 L de meio líquido seletivo LB, contendo ampicilina 100 mg.L<sup>-1</sup>, até a densidade óptica (A<sub>600</sub>) de 0,5. As culturas foram induzidas com isopropilil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,4 mM e incubadas a +20°C por 16 horas a 200 rpm. Após o período de indução, o nível de produção das proteínas foi avaliado por meio de extração de proteínas totais, solúveis e insolúveis (Novagen), as quais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) (Laemmli, 1970). As proteínas recombinantes fusionadas foram purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando resina de GST-Sepharose (Amersham), de acordo com instruções do fabricante. A eficiência da purificação foi confirmada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

### ***Ensaio de fosforilação***

Para o ensaio de fosforilação *in vitro*, as proteínas purificadas GST-KDNIK1, proteínas fusionadas a GST contendo o sítio ativo mutado (KDNIK1T474A, KDNIK1T474D, KDNIK1T474E, KDNIK1G473V/T474A, KDNIK1T469A, KDNIK1T468A/T469A, KDNIK1T474A/T468A, KDNIK1T474A/T469A,

KDNIK1T474A/S465A) e truncadas (KDNIK1<sup>Δ603-638</sup> e KDNIK1<sup>Δ584-638</sup>) foram incubadas sozinhas ou com GST-L10 (QM) ou GST-NSP a 25°C por 45 min em 30 µL de tampão de cinase contendo HEPES 18 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MnSO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 1 mM, ATP 10 µM e [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 5 µCi. As fosfoproteínas foram analisadas em SDS-PAGE. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* para verificar o avaliar a quantidade de proteínas, seco e submetido à autoradiografia. A radioatividade às proteínas foi quantificada por análise computacional usando-se o programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) e plotadas utilizando-se o software Excel (Microsoft Corporation).

### ***RT-PCR e qRT-PCR***

O RNA total foi extraído de plântulas de *Arabidopsis thaliana* utilizando 100 mg de tecido e TRIzol (Invitrogen). A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TBE 1X (Tris Base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M e EDTA 0,05 M, pH 8,0), corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro DU 650 BECKMAN em A<sub>260</sub>, e a concentração foi expressa em µg.µL<sup>-1</sup>. Para síntese do cDNA, foram utilizados 2 µg do RNA total como molde, 0,5 µM de oligonucleotídeo poli-dT, e 1U da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Inc.), segundo as instruções do fabricante. Para a reação de PCR, foram utilizados 5 µL de cDNA e oligonucleotídeos específicos para NIK1. Também foram utilizados oligonucleotídeos específicos para actina para avaliar a quantidade e qualidade do cDNA. As condições de reação adotadas foram de 3 min a 94° C, seguido de 30 ciclos (45 s a 94° C, 1 min e 30 s a 55° C e 2 min a 72° C), e posteriormente 10 min a 72° C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador Peltier Thermal Cycler PTC 200 (MJ Research Inc, USA) e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo 0,1 µg.mL<sup>-1</sup>.

Aproximadamente 3µg de RNA foram tratados com DNase I (Promega) e o cDNA obtido utilizando-se a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e oligo-dT de acordo com as recomendações do fabricante. Para a reação de polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR), foram construídos oligonucleotídeos específicos para a proteína NIK1, para actina e helicase, utilizando o programa Primer Express 3.0. As reações de qRT-PCR foram realizadas após validação dos oligonucleotídeos em ABI7500 (Applied Biosystems) usando 500 femtomoles dos oligonucleotídeos com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 95°C por 10 min e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O RNA do gene para

helicase de *A. thaliana* foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. O método  $2^{\Delta C_T}$  foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.

### ***Material vegetal, condições de crescimento, genotipagem e transformação***

Utilizou-se *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia e plantas nocautes para *NIK1* (salk\_060808) (Fontes *et al.*, 2004). Sementeiras foram realizadas em placas contendo meio MS1/2 força (adaptado de Murashige e Skoog 1962) e incubadas a 22°C, com fotoperíodo de 16 horas/luz e posteriormente transplantadas para vaso. Para a seleção de plantas nocautes homozigotas, foi extraído o DNA genômico e a genotipagem de SALK\_060808 foi realizada por PCR. Os alelos selvagens foram identificados com os oligonucleotídeos específicos para a identificação de alelos nulos de *NIK1* em combinação com o oligonucleotídeo Salk LB1-8 (Tabela 2 - Anexos).

Os clones pK7-NIK1G473V/T474A (descrito anteriormente) e pK7-NIK1 (Fontes *et al.*, 2004) foram utilizados para transformação por eletroporação da *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101. Colônias transformadas foram confirmadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos para o promotor 35S de CaMV (MC-36) e para a extremidade 3' do transgene *NIK1* (3315), resultando no clone pUFV653 e *NIK1\**, respectivamente que foram utilizados para transformação de plantas nocautes pela metodologia de agroinfiltração floral. Sementes de plantas submetidas ao protocolo de transformação foram semeadas em meio MS1/2 força (Murashige e Skoog, 1962) contendo 50 mg.L<sup>-1</sup> de canamicina para seleção de transformantes. A incorporação estável dos transgenes no genoma das plantas foi avaliada por meio de PCR e a expressão do transgene confirmada por RT-PCR em tempo real. Duas linhagens independentes foram obtidas para a transformação com clone pUFV 653 denominadas *NIK1M-A* e *NIK1M-B*.

### ***Localização subcelular***

Para a localização subcelular foi realizada a transformação transiente das proteínas *NIK1-GFP* (Fontes *et al.*, 2004) e *NIK1G473V/T474A-GFP* (pUFV646) em *Nicotiana tabacum* cv. *havana* via *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 (Kotzer *et al.*, 2004). As culturas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com os vetores de interesse foram crescidas em 4 mL de meio Rhizo, com antibióticos adequados, a 28°C por 16 horas, e centrifugadas a 8000 rpm por 5 min. O pellet foi lavado 2 vezes com tampão de infiltração (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES 10 mM pH 5,6 e acetosiringona 10 µM) e

ressuspendido em 1 mL do mesmo. Utilizando-se o êmbolo de seringas estéreis, folhas jovens de tabaco foram infiltradas com *A. tumefaciens* em uma densidade óptica de 0,2, por meio de uma gentil pressão em sua epiderme inferior. Após 72 horas de agroinfiltração explantes de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> foram excisados de folhas inoculadas e observadas utilizando-se o microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META invertido (Carl-Zeiss) com *argon laser*. Folhas foram diretamente observadas com a utilização de objetiva de imersão de óleo de 40x1,4. GFP foi excitada a 488 nm, e sua emissão foi detectada a 500-530 nm. O pinhole foi fixado, fornecendo uma faixa óptica de 1 a 1,5 µm. As imagens foram processadas com auxílio dos *softwares* “LSM Image Browser 4” (Carl-Zeiss) e Adobe Photoshop (Adobe Systems).

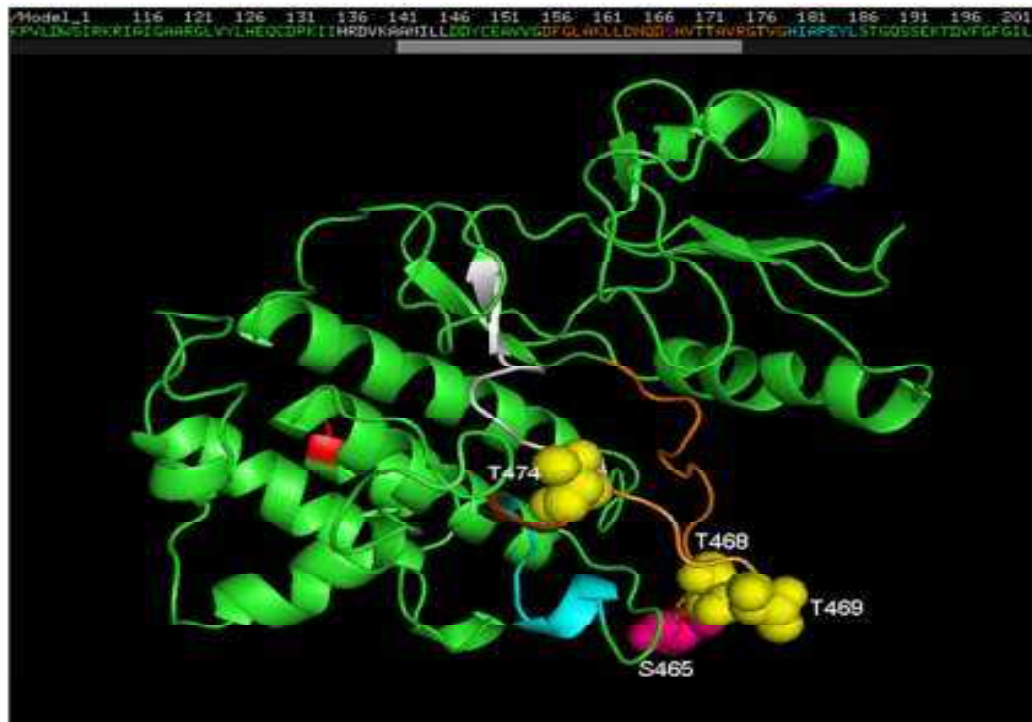
### ***Inoculação de CaLCuV e análise de plantas A. thaliana infectadas***

Plantas *A. thaliana* no estágio de sete de folhas foram inoculadas por biobalística com plasmídeos contendo repetições parciais do DNA-A (CaLCuV007) e do DNA-B de CaLCuV (1 e ½ cópia de cada um dos componentes) (Schaffer et al., 1995). Logo após o bombardeamento, as plantas foram transferidas para uma câmara de crescimento a 22° C, com 16 horas de fotoperíodo e observadas quanto ao aparecimento de sintomas (necrose foliar, clorose foliar, epinastia, enrolamento, enrugamento e morte de folhas jovens e atraso no desenvolvimento e crescimento) a em intervalos de dois dias e fotodocumentadas. O DNA total das plantas inoculadas foi extraído pelo método DellaPorta e utilizado como molde em reações de PCR utilizando oligonucleotídeos universais PCRC1 e PBL1v2040 (Rojas et al., 1993) e ou oligonucleotídeos específicos para o componente B de CaLCuV e para o transgene em reação tipo multiplex (566CLCVBFBR1v 1253CLCVBRBR1c em conjunto com os oligonucleotídeos MC36 e 3774).

## RESULTADOS

### *Alinhamento e identificação de resíduos de aminoácidos conservados em RLK's*

A seqüência deduzida da proteína NIK1 (At5g16000) contém 638 resíduos de aminoácidos (Mr 70,529kDa e pI 7,21) e é estruturalmente relacionada com a superfamília de receptores serine/treonine cinases RLK (*“Receptor-Like Kinase”*). Apresenta um domínio N-terminal composto por uma região rica em leucina que consiste de quatro repetições completas de 24 aminoácidos e uma quinta repetição incompleta apresentando 16 resíduos (Fontes *et al.*, 2004). Baseada na organização modular rica em leucina do seu domínio N-terminal, NIK pertence à subfamília LRRII-RLK (*“Leucine-rich repeat”*) da superfamília RLK (Shiu e Bleecker, 2001b). Entre os 14 membros da subfamília LRRII-RLK de *Arabidopsis*, NIK1 compartilha a maior identidade de seqüências com o produto do gene At3g25560 (NIK2), seguido por At2g23950 e posteriormente por At1g60800 (NIK3). O domínio LRR é seguido por um segmento de 23 resíduos de aminoácidos, que corresponde ao domínio transmembrana hidrofóbico, e, no C-terminal, um domínio catalítico de serina/treonina cinase, o qual apresenta os 11 subdomínios típicos da família de proteína cinases eucarióticas (Fontes *et al.*, 2004). A estrutura terciária global do domínio de cinase de NIK1 pode ser avaliada por comparação com a tirosina cinase IRK (insulin receptor), cuja estrutura tridimensional já foi resolvida. A modelagem molecular assistida por computador é apresentada na Figura 1<sup>a</sup>, que destaca, em vermelho, a alça de ativação da proteína, que compreende os subdomínios VII e VIII do domínio catalítico das proteínas cinases, em azul, o sítio ativo conservado, em amarelo o sítio de ligação a ATP e, em branco, o sítio P+1. A determinação da estrutura de cristais da forma fosforilada do receptor de insulina (IRK), uma tirosina cinase, demonstrou que fosforilação dos resíduos Tir 1162 e Tir 1163 presentes na alça de ativação provoca uma mudança conformacional drástica resultando em acesso irrestrito para ATP e para o substrato ao sítio ativo da proteína (Hubbard, 1997). O alinhamento do loop de ativação de NIK1 com os integrantes da família LRRII-RLK e o receptor tirosina cinase demonstra que os resíduos treonina 468, 469 e 474 em NIK1 são conservados e a posição 465 é ocupada por uma serina em NIKs ou treonina nas demais cinases (Figura 1B). Particularmente relevante é a observação de que a treonina 474 da proteína NIK1 está alinhada com o resíduo 468 da alça de ativação da proteína SERK1, cuja fosforilação tem papel crucial na ativação da cinase (Shah *et al.*, 2001).



**Alça de Ativação**

AtNIK1	AVVGD <b>F</b> GLAKLLD <b>H</b> QDS <b>H</b> VTTAVRG <b>T</b> VG <b>H</b> IAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> QSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GF <b>G</b> ILL <b>L</b>
LeNIK	AVVGD <b>F</b> GLAKLLD <b>H</b> QDS <b>H</b> VTTAVRG <b>T</b> VG <b>H</b> IAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> QSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GF <b>G</b> ILL <b>L</b>
GmNIK	AVVGD <b>L</b> GLAKLLD <b>Q</b> QDS <b>H</b> VTTAVRG <b>T</b> VG <b>H</b> IAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> QSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GF <b>G</b> ILL <b>L</b>
AtNIK2	AVVGD <b>F</b> GLAKLLD <b>H</b> EE <b>S</b> HVTTAVRG <b>T</b> VG <b>H</b> IAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> QSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GF <b>G</b> ILL <b>L</b>
AtNIK3	AVVGD <b>F</b> GLAKLLD <b>H</b> RD <b>S</b> HVTTAVRG <b>T</b> VG <b>H</b> IAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> QSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GF <b>G</b> ILL <b>L</b>
AtSERK1	AVVGD <b>F</b> GLAK <b>L</b> MD <b>Y</b> KD <b>T</b> HVTTAVRG <b>T</b> I <b>G</b> HIAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> KSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GY <b>G</b> IM <b>L</b> L
AtSERK3	AVVGD <b>F</b> GLAK <b>L</b> MD <b>Y</b> KD <b>T</b> HVTTAVRG <b>T</b> I <b>G</b> HIAPEY <b>L</b> ST <b>G</b> KSSEK <b>T</b> DV <b>F</b> GY <b>G</b> V <b>M</b> LL
	**:*:*:*:*: ::*:***:*****:***:*****:*:*:**
BRI1	ARV <b>S</b> DFG <b>M</b> AR <b>L</b> MS <b>A</b> MD <b>T</b> HL <b>S</b> V <b>S</b> T <b>L</b> AG <b>T</b> P <b>G</b> Y <b>V</b> PP <b>E</b> Y <b>Y</b> Q <b>S</b> FR <b>C</b> ST <b>K</b> GD <b>V</b> SY <b>G</b> V <b>V</b> LL
	** *.*:*:*:*:*: : : : : : : * * * : : * : : * : : * : : * : : *
IRK	V <b>K</b> IG <b>D</b> FG <b>M</b> TR <b>D</b> I <b>Y</b> ET <b>D</b> Y <b>R</b> K <b>G</b> G <b>K</b> GL <b>L</b> EP <b>R</b> W <b>M</b> AP <b>E</b> GL <b>N</b> D
IRAK4	AK <b>I</b> S <b>D</b> FG <b>L</b> AR <b>A</b> SAR <b>L</b> AQ <b>T</b> V <b>M</b> T <b>S</b> R <b>I</b> V <b>G</b> TT <b>A</b> Y <b>M</b> AP <b>E</b> AL <b>R</b> G

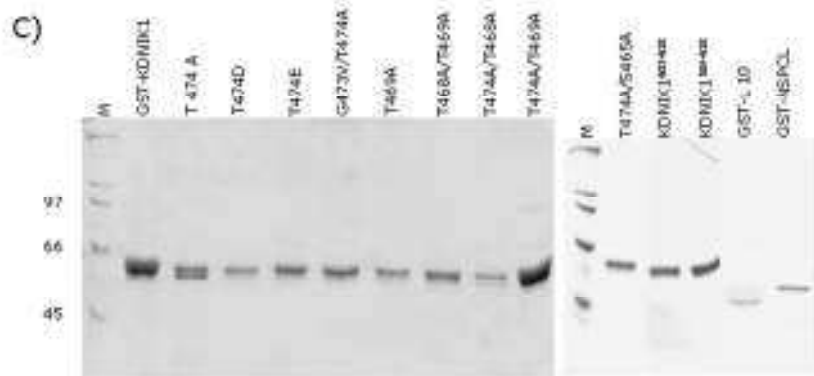
**Figura 1** – Domínio cinase da proteína NIK1. **A)** Modelagem do domínio catalítico da proteína NIK1 por meio do programa Swiss Model Workspace ([www.swissmodel.expasy.org/workspace](http://www.swissmodel.expasy.org/workspace)) visualizado com programa Pymol Viewer ([www.pymol.org/funding.html](http://www.pymol.org/funding.html)). Domínio cinase foi alinhado eletronicamente com o template 2oidB (Interleukin-1 [IL-1] receptor-associated kinase 4 – IRAK4) com 37% de identidade de seqüência e  $e\text{-value} = 7,99952e^{-38}$ . Porção N-terminal é mostrada em azul, C-terminal em vermelho, sítio de ligação a ATP em amarelo, sítio ativo conservado em azul, sítio P+1 em branco, alça de ativação em vermelho e resíduos de treoninas conservadas na alça de ativação são mostradas em amarelo e de serina em rosa.

**B)** Comparação de seqüência da alça de ativação da proteína NIK1 entre NIK's, SERK1, SERK3, BRI1, IRK e IRAK4. Alça de ativação delimitada por caixas. Setas indicam resíduos conservados entre proteínas cinases. Em vermelho, resíduo de treonina conservado entre as ser/thr cinases.

### ***Sítios de fosforilação na alça de ativação de NIK1 têm funções distintas***

Com a finalidade de elucidar o mecanismo que regula a ativação de NIK, os resíduos conservados de treonina foram utilizados como alvos racionais para mutação dirigida *in situ* (Figura 2A). Os respectivos domínios de cinase mutados foram expressos em *E.coli*, purificados (Figura 2C) e sujeitos a reação de autofosforilação *in vitro* (Figura 3).

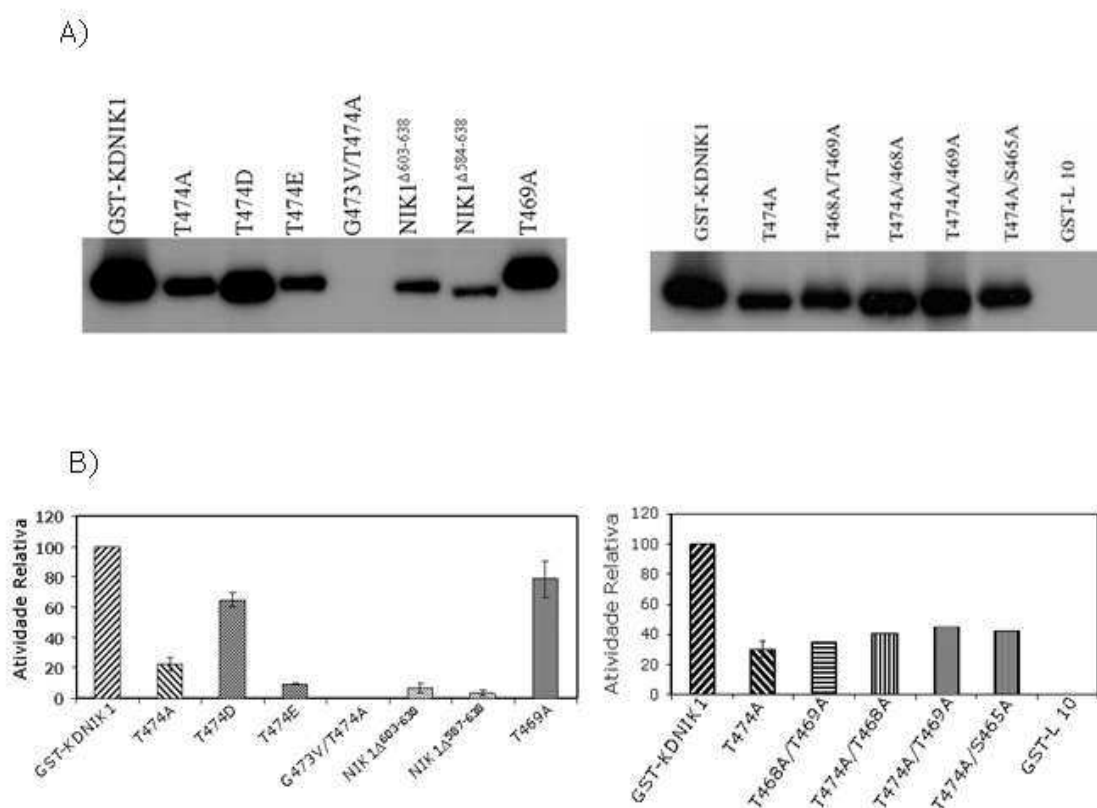
A fim de avaliar o papel da treonina 474 na sequência da proteína NIK1, este resíduo foi mutado para alanina, ácido glutâmico ou ácido aspártico. Substituição do resíduo de treonina 474 para alanina inibiu fortemente a autofosforilação do mutante T474A, que exibiu uma atividade residual de 22% em relação à proteína intacta, KDNIK1 (100%) (Figuras 3A e 3B). Provavelmente, este efeito foi devido a remoção do resíduo de treonina e não devido a natureza do aminoácido introduzido, porque ácido glutâmico na posição 474 (T474E) também causou similar inibição de transfosforilação de 100% para 10%. Entretanto, substituição da treonina 474 por ácido aspártico não causou impacto acentuado na atividade de autofosforilação, uma vez que o mutante KDNIK1T474D manteve autofosforilação no nível de 65% do nível observado na proteína não mutada. Provavelmente esta menor diminuição da atividade relativa ocorreu devido à perda de um grupamento de fosfato radioativo incorporado no mutante, ao invés de diminuição de atividade de autofosforilação da cinase. Estes resultados indicam que fosforilação da treonina 474 é essencial para a atividade de NIK, já que a introdução de uma carga negativa permanente, corretamente posicionada, na posição 474 restaura a atividade da cinase. Além disso, sugere-se que o mecanismo que regula a ativação da cinase depende de mudança de conformação induzida por fosforilação, uma vez que o ácido glutâmico na posição 474 antagoniza o processo de ativação provavelmente por impor restrição estérica a mudança de conformação necessária. De fato, substituição do resíduo de glicina 473 por valina em conjunto com mutação no resíduo de treonina 474 para alanina (mutante G473V/T474A), aboliu totalmente a capacidade de autofosforilação da proteína NIK1 (0,4%), indicando uma forte restrição estérica que possivelmente, impede a ativação da cinase. Mutação simples na treonina 469 por resíduo de alanina, por outro lado, não causa impacto significativo na capacidade de autofosforilação da proteína mutante. A ausência de um possível sítio de fosforilação no mutante T469A pode justificar a redução da radioatividade incorporada no mesmo para 79% da proteína intacta, sem contudo alterar a atividade de autofosforilação da proteína (Figuras 3A e 3B).



**Figura 2 - Mutações na proteína NIK1.** A) Comparação de seqüência da alça de ativação entre proteínas NIK's normal e mutadas. As setas indicam resíduos de aminoácidos conservados em proteínas NIK's e SERK's. A posição e os resíduos utilizados para mutação são mostrados em vermelho na seqüência de NIK1 normal. Os resíduos de aminoácidos substituídos são mostrados em azul. B) Representação esquemática das construções contendo deleções no domínio C-terminal na seqüência de NIK1 (KDN1K1<sup>603-638</sup> [NIK1Δ1810] e KDN1K1<sup>587-638</sup> [NIK1Δ1762]). C) Análise em SDS-PAGE da purificação do domínio cinase ativo das proteínas recombinantes. NIK1, NIK1 mutadas, NSPCL e L-10 fusionadas a GST foram estavelmente produzidas em *E. coli* e purificadas, como indicado em cada canaleta. Após a separação os géis de poliácridamida, as proteínas recombinantes foram coradas com Coomassie Brilliant Blue e o gel fotografado. M representa marcador de massa molecular. Proteínas estão indicadas nas canaletas.

Para confirmar o papel regulatório do resíduo T474, mutações duplas foram obtidas. Os domínios cinase mutantes T474A/T468A, T474A/T469A e T474A/S465A foram fusionados a GST, purificados (Figure 2C) e utilizados em ensaio de fosforilação (Figure 3B). Nestes experimentos, a capacidade de autofosforilação se mostrou diminuída para todas as mutações duplas, variando de 20 a 40% da atividade de fosforilação em trans quando comparadas a observada no domínio cinase fusionado a GST não mutado (Figura 3B). Embora mutação simples na posição T468 não tenha sido obtida, a substituição desse resíduo por alanina no mutante KDNIK1T469A (gerando KDNIK1T468A/T469A) causou redução na atividade de fosforilação para 30% comparado com a cinase intacta e sugere, portanto, que o resíduo T468 também exerce função relevante na ativação da cinase.

Além da alça de ativação, foi demonstrado que a fosforilação de resíduos no terminal carboxílico de serina/treonina cinases exerce função relevante no mecanismo de sinalização de receptores de membrana (Lee et al., 2003). A proteína NIK1 possui resíduos de serina no terminal carboxílico que constituem sítios putativos de fosforilação de serina/treonina cinases. Para avaliar estes sítios como potenciais sítios de fosforilação, foram obtidas duas versões truncadas do domínio cinase de NIK1 (Figura 2B). Na versão GST-KDNIK1<sup>Δ603-638</sup>, foi deletado o fragmento C-terminal de 36 resíduos de aminoácidos, contendo três resíduos de serinas (posições 613, 615 e 619) como potenciais sítios de fosforilação conforme deduzido pelo programa NetPhos 2.0 Server. Na versão GST-KDNIK1<sup>Δ584-638</sup>, a deleção no C-terminal estendeu até o resíduo 583, eliminando assim mais quatro resíduos de serina (posições 602, 600, 598 e 597) como potenciais sítios de fosforilação (Figura 2B). Os ensaios de autofosforilação demonstraram uma redução drástica na atividade de fosforilação, para 6,6 %, em relação ao domínio cinase não mutado, no caso da proteína truncada GST-KDNIK1<sup>Δ603-638</sup>, e para 3,2% no caso de GST-KDNIK1<sup>Δ584-638</sup> (Figuras 3A e 3B). Portanto, ambas as deleções causaram uma redução similar na atividade de fosforilação da proteína indicando que o fragmento C-terminal, posição 603 a 638, contém determinantes de atividade ou sítios de fosforilação, ou ambos.



**Figura 3 - Atividade de autofosforilação da proteína NIK1 e formas mutantes.** Os domínios cinases fusionados a GST das proteínas NIK1 normal e mutadas foram induzidos utilizando 0,4 mM de isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopiranosideo por 12 horas a 22°C e purificada por afinidade. A atividade cinase foi verificada in vitro por incubação das proteínas com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . A) As reações foram separadas em SDS-PAGE 10% e coradas por Coomassie Brillant Blue (CBB), após separação as proteínas foram visualizadas por autoradiografia. B) A intensidade relativa de fosforilação foi quantificada diretamente das autoradiografias utilizando-se o software Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) e plotadas utilizando-se o software Excel (Microsoft Co.). Proteínas utilizadas estão indicadas na figura. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram expressos em unidade/ $\mu\text{g}$  de enzima/min.

### ***Inibição da atividade cinase de NIK1 por NSP***

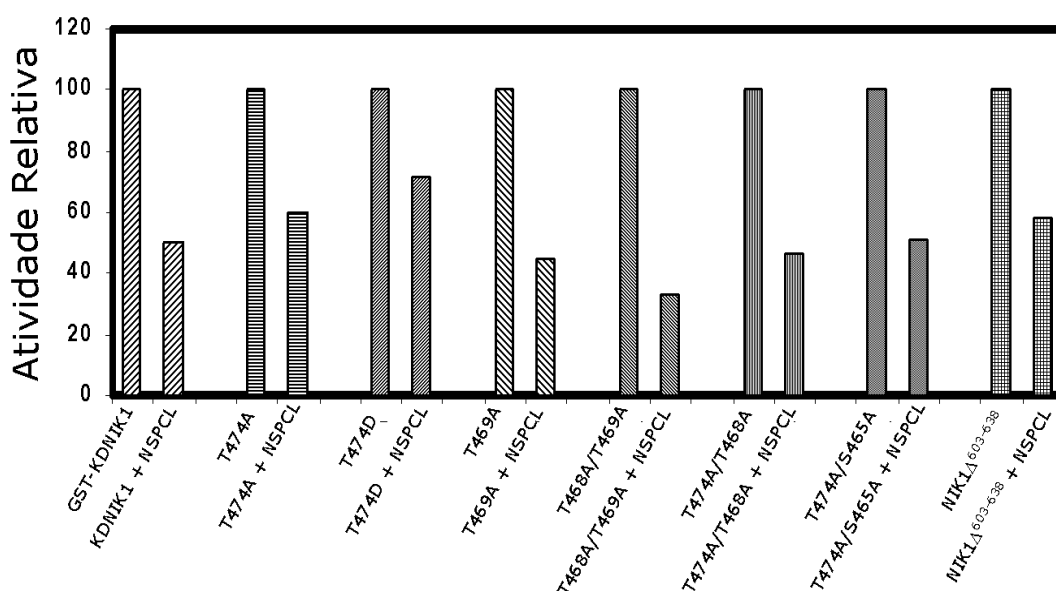
A observação de que o domínio de interação de NSP em NIK1 sobrepõe-se aos sub domínios VIb e VIII da cinase (Fontes *et al.*, 2004) levantou a possibilidade de que ligação de NSP a NIK1 pudesse impedir a fosforilação da alça-A e, conseqüentemente, prevenir a ativação da cinase. Consistente com as observações prévias, a inclusão da proteína NSP de CaLCuV fusionada a GST em ensaios de fosforilação “in vitro” provocou uma redução de 50%, em média, da atividade de autofosforilação de NIK1 (Figura 4). Exceto para o mutante T474D, NSP efetivamente causou uma diminuição adicional de 50% na atividade dos outros mutantes de NIK1, independentemente da presença de mutações em resíduos conservados da proteína (Figura 4). Entretanto, no caso do mutante T474D, o efeito de NSP na atividade da cinase foi mais atenuado, provocando uma redução de apenas 22% na atividade do mutante. Este resultado sugere duas hipóteses, a primeira de que a presença de uma carga negativa permanente na posição essencial da Treonina 474 desestabiliza o complexo NSP-NIK e a segunda de que a presença desta carga negativa elimina o efeito de inibição de fosforilação por NSP nesta posição. Ambas as alternativas são consistente com um mecanismo de inibição que prevê que a formação do complexo NSP-NIK modula o estado de fosforilação da alça de ativação de NIK1 e, conseqüentemente, a ativação da cinase.

Com relação a versão truncada de NIK1, a capacidade de NSP de causar uma redução de 50% na atividade de NIK1<sup>Δ603-638</sup> (Figura 4), indica que a proteína viral é capaz de se ligar estavelmente à cinase truncada. Estes resultados sugerem que a remoção do fragmento C-terminal de 36 resíduos de aminoácidos não provocou um desenovelamento global da proteína, mantendo a organização estrutural nativa do sítio de ligação de NSP. Provavelmente, a redução da atividade de autofosforilação dessa versão truncada (Figuras 3A e 3B) reflete a perda de prováveis sítios de fosforilação no C-terminal, ao invés de estar associada com a perda de determinantes estruturais presentes no fragmento deletado.

### ***Identificação de substrato endógeno da proteína NIK1***

Em ensaio de duplo híbrido, utilizando proteína NIK1 como isca e uma biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, foram isolados dois cDNAs que codificam proteínas citoplasmáticas (Fontes – informação pessoal). Entre elas, a proteína L10 (QM) foi identificada como uma proteína ribossomal (publicação em preparação) que está

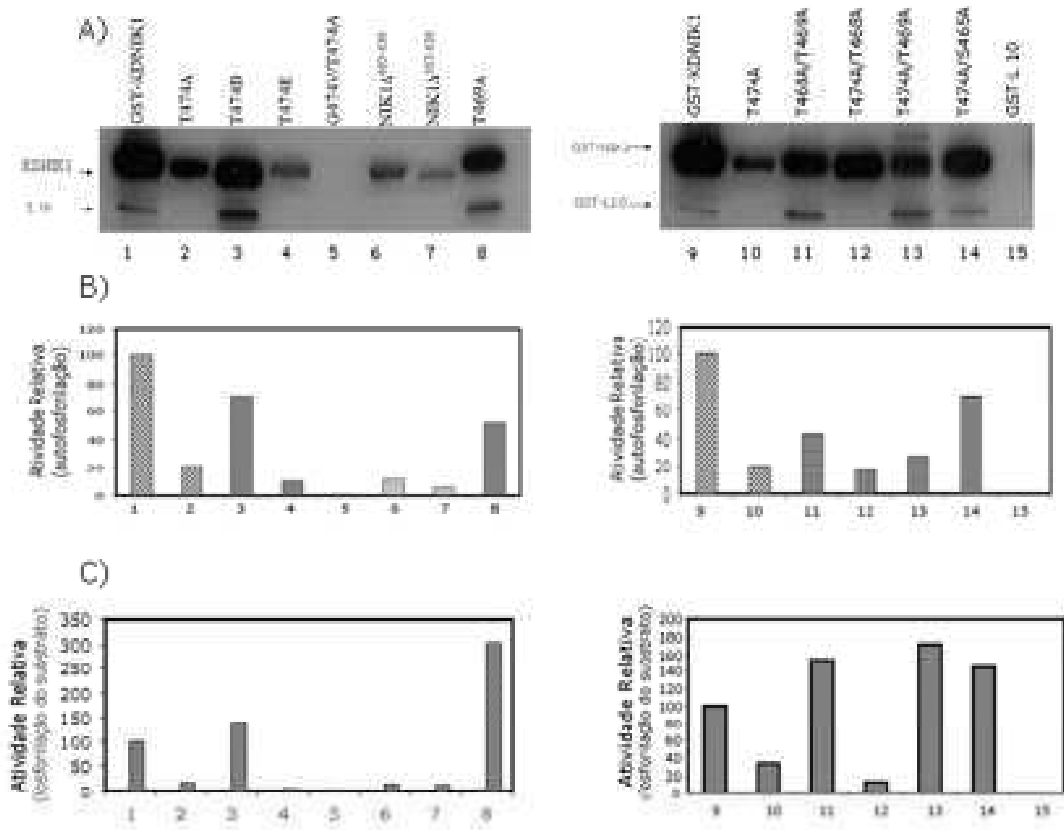
envolvida em vias de supressão de tumores (Oh *et al.*, 2002). Nesta investigação, L10 foi produzida em *E. coli* como uma proteína recombinante fusionada a GST e purificada para utilização em ensaios de fosforilação que demonstraram que L10 pode ser eficientemente fosforilada por NIK1 (dado não mostrado). Estes resultados demonstraram que NIK1 funciona como um receptor de atividade dupla, ou seja, possui capacidade de autofosforilação e de fosforilação do substrato, e que a proteína L10 pode atuar como substrato endógeno natural para NIK1. Assim, a proteína L-10 pode ser considerada uma forte candidata a participar efetivamente da via de sinalização da proteína NIK1.



**Figura 4 - Inibição da atividade cinase de NIK1 pela proteína NSP de CaLCuV.** Os domínios cinases das proteínas NIK1 normal e mutantes, selecionados a partir de sua capacidade de autofosforilação, foram incubados com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  na ausência e na presença da proteína NSP de CaLCuV fusionada a GST. As reações foram separadas em SDS-PAGE 10% e coradas por Coomassie Brillhante Blue (CBB). Posteriormente as proteínas foram visualizadas por autoradiografia. A intensidade relativa da atividade cinase de cada domínio cinase fusionado a GST utilizado no ensaio foi quantificada através do programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) em relação à proteína incubada na ausência de GST-NSPCL e plotadas utilizando-se o software Excel (Microsoft Co).

### ***Capacidade de fosforilação de substratos das proteínas NIK mutadas e truncadas***

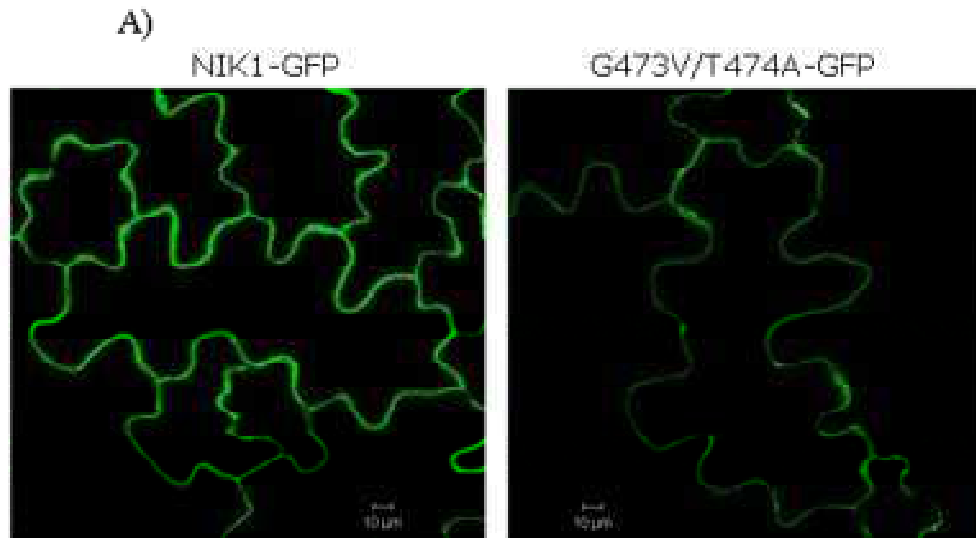
Para determinar a capacidade de cada proteína mutante em fosforilar o substrato endógeno L10, mutantes e substrato foram avaliados em ensaio de fosforilação “in vitro”. De um modo geral, as mutações que afetaram negativamente a atividade de autofosforilação da proteína cinase, tais como T474A, T474E, G473V/T474A, T468A/T474A, também reduziram a capacidade da proteína cinase de fosforilar o substrato rpL10 (Figura 5). Estes resultados estão consistentes com o mecanismo que regula a atividade de serina/treonina cinases, em que autofosforilação promove ativação da cinase e precede a fosforilação do substrato (Hubbard, 1991, Kornev *et al.*, 2006). Enquanto a substituição da treonina essencial 474 por um resíduo de ácido aspártico no mutante T474D não afetou significativamente a atividade de transfosforilação (Figuras 3B e 5B) e, esta mutação promoveu um aumento de 1,5 vezes na atividade de fosforilação do substrato (Figura 5C). Esta observação sugere que a introdução de uma carga negativa corretamente posicionada na posição 474 causa ativação constitutiva da proteína, mimetizando a fosforilação induzida do resíduo de treonina 474. Além disso, indica que fosforilação da treonina 474 é possivelmente o fator determinante de ativação da cinase. Por outro lado, o mutante T469A apresentou uma capacidade de autofosforilação pouco inferior à proteína nativa, mas exibiu a atividade de fosforilação do substrato 3 vezes superior a mesma (Figuras 5B e 5C). Provavelmente, a fosforilação da treonina 469 inibe a fosforilação do substrato, já que sua substituição por alanina alivia a repressão e aumenta a capacidade da enzima de fosforilar L10. Este efeito inibitório do resíduo T469 explica porque as mutações que reduzem a autofosforilação quando em conjunto com mutação em T469, tais como T468A/T469A e T474A/T469A (Figura 5C), aumentam a fosforilação do substrato. Da mesma forma, a fosforilação do resíduo de serina 465 parece inibir a fosforilação do substrato, uma vez que quando substituída por alanina, conjuntamente com mutação na treonina 474 essencial para ativação da cinase, o mutante duplo exhibe autofosforilação reduzida, mas fosforilação do substrato aumentada (Figure 5C).



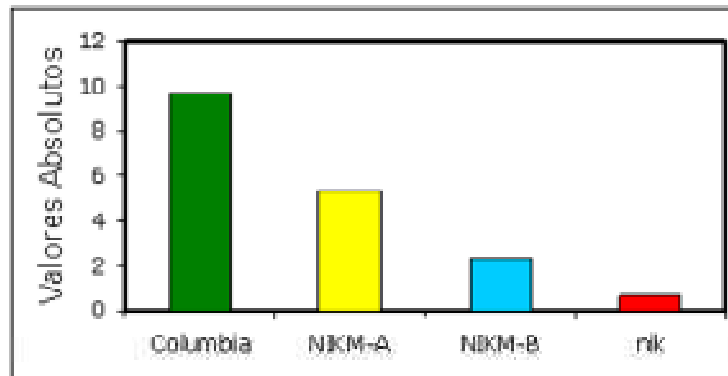
**Figura 5 – Atividade de fosforilação do substrato da cinase de NIK1 e mutante. A)** Proteínas GST-KDN1K1 normal e mutantes foram induzidas, purificadas e incubadas com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  na presença de GST-L-10. As reações foram separadas em SDS-PAGE 10% coradas por Coomassie Brillhante Blue (CBB), após separação, as proteínas foram visualizadas por autoradiografia. **B)** A intensidade relativa da atividade cinase de cada versão da proteína NIK1 utilizada no ensaio foi quantificada através do programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) em relação à proteína não mutada, plotadas utilizando-se o software Excel (Microsoft Co) e expressa como a intensidade intensidade relativa da incorporação de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  por unidade de proteína NIK1 e mutantes conforme o experimento. **C)** A intensidade da incorporação de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  na proteína rpL10 utilizada no ensaio foi quantificada através do programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm) em relação à fosforilação de rpL10 na presença da proteína NIK1 não mutada, plotadas utilizando-se o software Excel (Microsoft Co) e expressa como a intensidade intensidade relativa da incorporação em rpL10 por unidade de proteína NIK1 por unidade de substrato conforme descrição no experimento anterior. Números no eixo x dos gráficos são relativos às canaletas do ensaio de fosforilação acima (5A) conforme indicado na figura. Os dados foram expressos em unidade/ $\mu\text{g}$  de enzima/min para a NIK's e unidade/ $\mu\text{g}$  de enzima/ $\mu\text{g}$  de sustrato/min para L-10.

### ***O domínio cinase é requerido para sinalização anti viral mediada por NIK1***

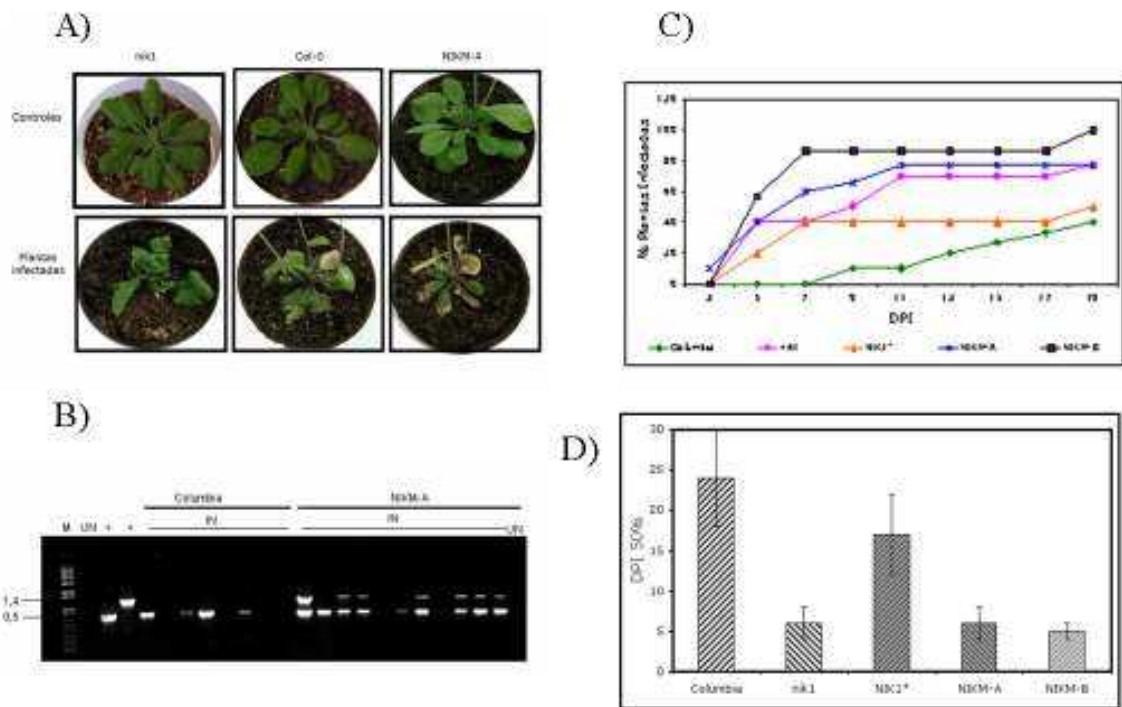
A proteína NIK1 foi descrita como um receptor de sinalização que medeia uma resposta de defesa antiviral com base em suas propriedades bioquímicas de cinase caracterizadas “in vitro”, na inibição de sua atividade cinase decorrente da proteína NSP de geminivírus e no aumento de suscetibilidade à infecção por CaLCuV em plantas nocautes (Fontes et al., 2004). Com a finalidade de confirmar se a sinalização anti-viral mediada por NIK é de fato transduzida pelo domínio intracelular com atividade cinase, ensaios ‘in vivo’ de complementação de função foram conduzidos por meio de expressão da proteína NIK intacta ou da proteína NIK inativa (G473V/T474A) em plantas nocautes para *NIK1* (salk\_060808). As plantas transformadas com cada uma das construções foram confirmadas por PCR (dados não mostrados) e a expressão do transgene por RT-PCR em tempo real (Figura 6B). Além disso, foi demonstrado, por meio de ensaios de expressão transiente em tabaco, que o receptor mutante inativo acumula estavelmente e se localiza corretamente na membrana plasmática de células transformadas (Figura 6A). As linhagens transgênicas expressando a proteína NIK intacta (NIK\*) ou a proteína mutante (NIKM-A e NIKM-B), foram inoculadas via biobalística com clones infecciosos correspondentes a uma copia e meia do DNA-A e DNA-B de CaLCuV, conforme descrito por Fontes et al. (2004). Todas as linhagens inoculadas apresentaram sintomas típicos de infecção por CaLCuV, porém com intensidades diferentes (Figura 7A). O acúmulo do DNA viral foi diagnosticado por PCR, utilizando multiplex contendo oligonucleotídeos específicos para o transgene e para o DNA viral (Figura 7B). A expressão da proteína NIK1 intacta nas plantas nocautes recuperou o fenótipo selvagem quanto à suscetibilidade à infecção viral, sendo que as linhagens transformadas exibiram sintomas mais atenuados com taxa de infecção similar a de plantas Col-0 (Figuras 7C e 7D). Em contraste, expressão da cinase inativa nas plantas nocautes não foi capaz de complementar *nik1* e as plantas transformadas (linhagens independentes NIKM-A e NIKM-B) exibiram o mesmo fenótipo de susceptibilidade aumentada dos nocautes (Figuras 7C e 7D). Estes resultados confirmam que a atividade de cinase de NIK1 é requerida para sua função de sinalização anti-viral.



B)



**Figura 6 – Expressão de proteínas NIK1.** **A)** Localização celular de proteína NIK1-GFP e NIK1G473V/T474A-GFP em folhas de *Nicotiana tabacum*. A figura corresponde à análise por microscopia confocal 72 horas após agroinfiltração de folhas de *Nicotiana tabacum* com as construções de DNA contendo o cDNA de NIK1 e do mutante duplo NIK1G473A/T474A fusionados a GFP e sob o controle do promotor 35S. **B)** Expressão estável da proteína NIK1 em *Arabidopsis thaliana*. Plantas nocautes *nik1* foram estavelmente transformadas com NIK1 normal (NIK\*) e dois transformantes independentes de NIK1G473V/T474A (NIKM-A e NIKM-B) e a expressão do transgene analisada por RT-PCR em tempo real, conforme indicado. Col-0 corresponde à expressão de NIK1 endógena em plantas selvagens.



**Figura 7 – Ensaio de complementação dos alelos nulos *nik1*.** Plantas selvagem (Columbia), *nik1*, NIK1\* e dois transformantes independentes (NIKM-A e NIKM-B) obtidos de transformação de plantas nocautes com vetor binário contendo NIK1G473V/T474A foram infectadas com componentes A e B de CaLCuV pelo método biolístico. **A)** Sintomas associado à infecção por CaLCuV. Acima, *nik1* (esquerda), Col-Ø (centro) e NIKM (direita) são plantas bombardeadas somente com partículas de tungstênio sem DNA viral. Abaixo, *nik1* (direita), Col-Ø (centro) e K0+NIK1G473V/T474A, NIKM (esquerda) são plantas infectadas por CaLCuV após 14 dias de infecção. **B)** Acúmulo do DNA viral em plantas infectadas. O DNA total foi isolado de plantas Columbia e NIKM com 7 DPI (dias pós inoculação) e diagnosticado por PCR com primers específicos para o DNA viral e para o transgene. IN refere-se às plantas inoculadas com DNA viral e UN refere-se às plantas inoculadas somente com tungstênio. **C)** Gráfico da porcentagem de plantas sistematicamente infectadas em diferentes DPI determinado pelas médias de três experimentos independentes. **D)** Taxa de infecção. A taxa de infecção foi expressa como o número de dias necessários para alcançar 50% de plantas infectadas (DPI 50%). Os dados são a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes.

## DISCUSSÃO

A proteína NIK foi identificada pela sua capacidade de interagir com a proteína de geminivírus NSP (Mariano *et al.*, 2004). A ligação de NSP a NIK inibe sua atividade de cinase e a inativação do gene *NIK* aumenta a susceptibilidade à infecção por geminivírus (Fontes *et al.*, 2004). Estas observações têm levado à hipótese de que NIK medeia uma resposta de defesa anti-viral. Sendo um receptor do tipo cinase (RLK), NIK utiliza-se da estratégia de fosforilação reversível tanto para iniciar a via de sinalização de defesa quanto para modular a resposta adaptativa. Nesta investigação, foi demonstrado que o estado de fosforilação da alça de ativação de NIK modula a atividade global do domínio de cinase que é transduzida em autofosforilação da proteína seguida por fosforilação de substratos, como possíveis módulos de sinalização. Sítios de fosforilação conservados foram mapeados na alça de ativação de NIK e foi demonstrado que exercem funções distintas na autofosforilação e fosforilação do substrato. Por meio de mutação sítio dirigida, foram identificados os resíduos Thr-468 e Thr-474 como alvos em potencial de auto-fosforilação intermolecular, exercendo uma regulação positiva na atividade de cinase. Comparação de seqüências de aminoácidos demonstrou que estes resíduos estão corretamente posicionados com os resíduos Thr-462 e Thr-468 de SERK1, mantendo uma perfeita sobreposição entre eles nas modelagens moleculares da alça de ativação das proteínas SERK1 e NIK1 (Figura 1). Ambos os resíduos Thr-462 e Thr-468 de SERK1 exercem funções relevantes, sendo que o resíduo de Thr-468 é absolutamente essencial para atividade da cinase (Shah *et al.*, 2001). Os resultados dessa investigação implicam Thr-468 e Thr-474 de NIK1 como análogos funcionais de Thr-462 e Thr-468 de SERK1, respectivamente. Mutações individuais nos respectivos resíduos de NIK1 causam 80% de redução na trans-autofosforilação da cinase que leva a uma redução equivalente na atividade de fosforilação do substrato. Estes resultados são consistentes com o mecanismo de ativação de cinases em que a fosforilação da alça de ativação induz mudanças conformacionais que posicionam corretamente os resíduos aminoacídicos do domínio catalítico da cinase na interação com os aminoácidos do substrato (Johnson *et al.*, 1996). Fosforilação da alça de ativação constitui um dos mecanismos regulatórios-chaves que modulam a atividade catalítica de proteínas tirosinas cinases (Hubbard, 1997; Kornev *et al.*, 2006) e serina/treonina cinases (Shah *et al.*, 2001). Duas linhas de evidências indicam que, pelo menos para o caso de Thr-474, a natureza regulatória deste resíduo de aminoácido sobre a atividade da cinase é devido à fosforilação. Inicialmente, os níveis da redução de autofosforilação pela substituição de Thr-474 para alanina ou ácido glutâmico foram similares, eliminando o efeito de identidade de aminoácido

introduzido na estrutura global da proteína. Em segundo lugar, a introdução de uma carga negativa permanente em substituição a alanina através do ácido aspártico não alterou a atividade de autofosforilação, mas aumentou a eficiência de fosforilação do substrato. Provavelmente, a presença do ácido aspártico mimetizou o estado de fosforilação da Thr-474, causando ativação constitutiva da cinase. A ativação constitutiva de serina/teroninas cinases pela substituição de resíduos de treonina presentes na alça de ativação por ácido aspártico tem sido previamente demonstrada para SOS2 (SALT OVERLY SENSITIVE3) e PKS11 [(Salt Overly Sensitive 2)-like protein kinases – PKS] (Guo *et al.*, 2001 e Gong *et al.*, 2002 ). Coletivamente, estes resultados de mutações sítio-dirigidas substanciam o argumento de que fosforilação do sítio de ativação de receptores do tipo serina/treonina constitui um mecanismo relevante de ativação de vias de sinalização em plantas.

Foi também demonstrado que os resíduos Thr-469 e Ser-465 presentes na alça de ativação não exercem impacto significativo na auto-fosforilação mas funcionalmente antagonizam os resíduos Thr-468 e Thr-474 na atividade potencial de fosforilação do substrato, porque parecem inibir a fosforilação do substrato. De fato, substituição individual desses resíduos por alanina alivia a repressão e aumenta consideravelmente a fosforilação do substrato. Não existem precedentes na literatura sobre a identificação de resíduos de treonina com função regulatória negativa na alça de ativação de receptores do tipo serina/treonina. Fosforilação de resíduos de treonina e/ou serina na alça de ativação tem sido demonstrada “*in vitro*” para SERK1 e *in vivo* para BRI1 (Wang *et al.*, 2005). Entretanto, todos os resíduos fosforilados, funcionalmente relevantes, exercem regulação positiva na atividade da cinase. Os resultados dessa investigação sugerem que a fosforilação dos resíduos Thr-469 e Ser-465 previne fosforilação do substrato. Uma explicação possível seria que a fosforilação desses resíduos bloqueia a mudança de conformação induzida por fosforilação no resíduo relevante Thr-474, impedindo o movimento da alça de ativação e limitando a acessibilidade do substrato ao domínio catalítico da enzima. A estrutura deduzida de cristais do receptor de insulina fosforilado demonstra que mudanças de conformação, induzidas por fosforilação de tirosinas na alça de ativação, regulam a capacidade de ligação de ATP e/ou de interação ao substrato (Kornev *et al.*, 2006; Hubbard, 2007). Alternativamente, a introdução de uma alanina “*per si*” nas posições 469 ou 465 alivia o bloqueio estérico imposto pela estrutura natural da alça de ativação, facilitando a acessibilidade do substrato ao domínio catalítico da enzima. A alça de ativação do receptor de insulina não fosforilado impede estericamente a interação do substrato protéico e da molécula de ATP ao sítio ativo da cinase (Hubbard, 1997). Experimentos adicionais para determinar se os resíduos Thr-469 ou Ser-465 de NIK1 são fosforilados, além de mutações alternativas nestas posições, serão necessários para distinguir entre estas possibilidades.

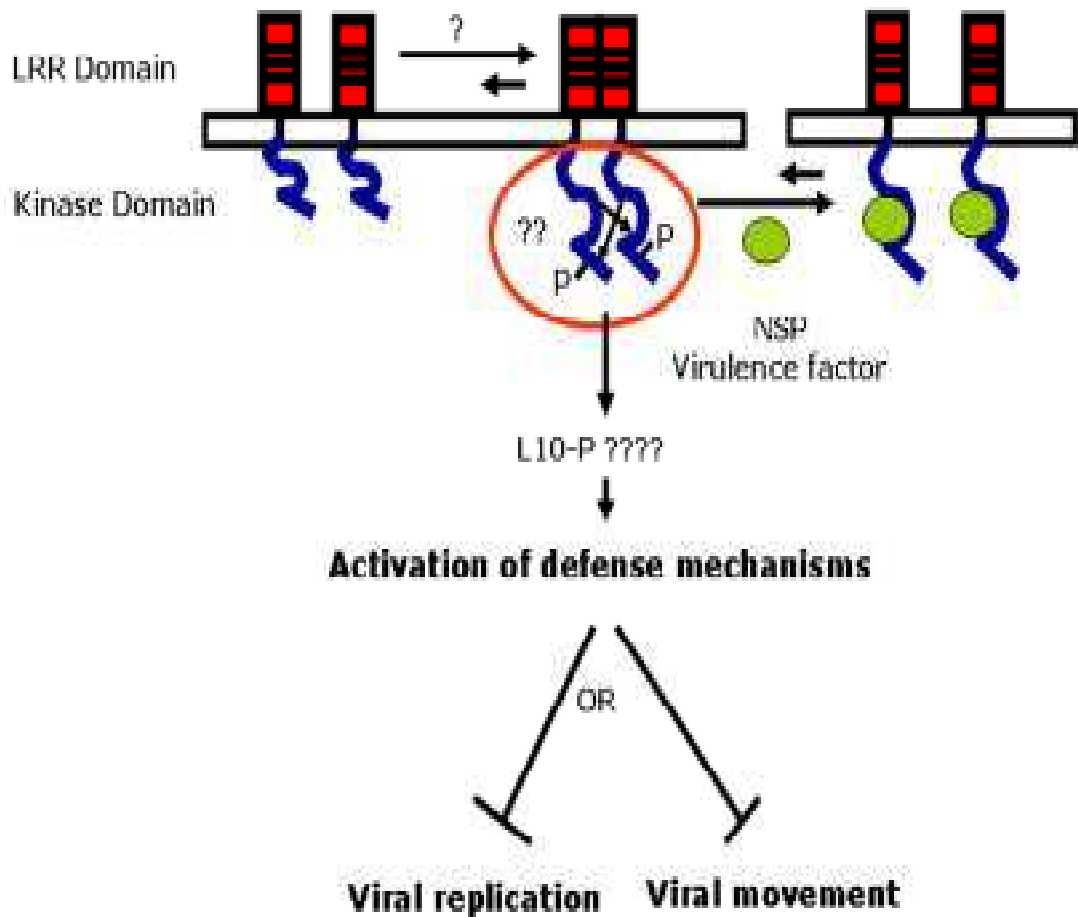
A proteína de geminivírus NSP efetivamente inibe a atividade de trans-autofosforilação de NIK (Fontes et al., 2004 e Figura 4). O sítio de interação com NSP, mapeado em NIK1, corresponde a uma extensão de 81 resíduos de aminoácidos que contém o sítio de ativação de serina/treonina cinase (subdomínio VIb – HrDvKssNxLLD) e a alça de ativação (A-Loop) (subdomínio VII – DFGAk/rx, mais o subdomínio VIII – GtxGyiaPEY) (Fontes *et al.*, 2004). Inclusão de NSP nas reações de autofosforilação das proteínas mutantes causou uma redução adicional na atividade de cinase para todos os mutantes ensaiados (Figura 4). Estes resultados indicam que NSP é capaz de associar-se estavelmente com todos os mutantes e, ainda que, as mutações introduzidas não causaram uma desestruturação global da proteína. Assim, a formação do complexo NSP-NIK pode ser um indicador do estado estrutural do domínio de ligação de NSP que contém a alça de ativação. Entretanto, o efeito inibitório de NSP foi atenuado no mutante em que a Thr-474 essencial foi substituída por ácido aspártico. Uma vez que este mutante mimetiza o estado fosforilado de Thr-474, é razoável supor que NSP atua “downstream” à fosforilação desse resíduo, prevenindo ativação da cinase. Mapeamento do domínio de interação de NSP permitirá a modelagem de peptídeos com o potencial de inibir receptores do tipo serina/treonina cinase.

Tem sido proposto que a fosforilação no C-terminal do receptor BRI1 induz mudanças conformacionais que aliviam o bloqueio estérico que este segmento exerce sobre a alça de ativação (Wang *et al.*, 2005). O fragmento C-terminal (603-638) de NIK1 também contém determinantes de atividade, uma vez que a remoção de fragmentos (posições 584-638 ou posições 603-638) da região carboxi-terminal de NIK1 causou uma redução de mais de 90% na atividade de trans-autofosforilação da cinase (Figure 3B). Isto implica que o C-terminal de NIK1 exerce regulação positiva diferentemente do mecanismo proposto para a mesma região de BRI1. Provavelmente, a remoção do segmento carboxi-terminal não promoveu desestruturação global do domínio cinase que poderia explicar a baixa atividade de NIK1<sup>606-638</sup>, uma vez que NSP foi capaz de ligar e inibir a atividade residual da proteína truncada. Além de fosforilação da alça de ativação, receptores do tipo cinase podem utilizar-se de fosforilação de resíduos no C-terminal da proteína como pontos de reconhecimento para recrutamento de substratos (Lee *et al.*, 2003). Consistente com esta hipótese, o segmento C-terminal funcional de NIK1 contém quatro sítios putativos de fosforilação, sendo que a remoção desse fragmento aboliu totalmente a atividade de fosforilação do substrato. Entretanto, para validar esta interpretação, torna-se absolutamente necessário confirmar os sítios de fosforilação no domínio carboxi-terminal da proteína.

A função de *NIK* como gene de defesa foi descrita baseado em experimentos de genética reversa, associando o fenótipo de aumento de suscetibilidade à geminivírus com

perda da função do gene *NIK*. Nesta investigação, ensaios de complementação de alelos nulos demonstraram que NIK atua como um receptor verdadeiro, utilizando o domínio de cinase para transduzir um sinal de defesa que resulta em uma resposta adaptativa. De fato, enquanto a expressão de NIK1 no genótipo *nik1* restaurou o fenótipo selvagem diminuindo a suscetibilidade ao vírus, o mutante duplo G473A/T474A, cuja atividade de cinase é nula, não foi capaz de reverter o fenótipo de maior suscetibilidade aumentada da planta nocaute, mantendo uma taxa de infecção alta e desenvolvendo sintomas severos. Coletivamente, os resultados da presente investigação e do capítulo anterior sugerem um modelo para via de sinalização anti-viral mediada por NIK e sua interação com a proteína viral NSP (Figura 8). Diante de um estímulo de natureza desconhecida, o domínio LRR extracelular de NIK promove a oligomerização da proteína trazendo os domínios de cinase intracelulares dos monômeros em proximidade. Isto permite que um monômero fosforile em trans a alça de ativação do outro promovendo ativação da cinase e levando, provavelmente, à fosforilação do C-terminal. A cinase ativa recruta o substrato endógeno, provavelmente L10. A fosforilação de componentes “downstream” mediada por NIK1 leva à ativação de uma resposta adaptativa que causa um impacto negativo na replicação ou no movimento do vírus. Ligação de NSP no seu sítio de interação, sobrepondo a alça de ativação, previne fosforilação da Thr-474 essencial, inibindo a ativação da cinase e, conseqüentemente, a via de sinalização anti-viral mediada por NIK.

Como perspectiva futura, seria relevante elucidar como a resposta mediada por NIK atua para impedir a proliferação ou o movimento do vírus na planta, levando a um aumento de tolerância. A descoberta de que NIK interage e fosforila eficientemente a proteína rpL-10 (QM) (At1g14320) *in vitro*, sugere que rpL10 possa ser um dos componentes imediatamente “downstream” da via de sinalização de defesa. rpL10 é uma proteína ribossomal (RPL10A) estruturalmente relacionada com a proteína QM codificada pelo gene supressor de tumor de Wilms (Dowdy et al., 1991). Pode-se especular pelo menos dois mecanismos gerais pelos quais uma via de sinalização que envolve rpL10/QM possa interferir diretamente para limitar a infecção viral. Primeiro, as respostas mediadas por NIK podem controlar a velocidade de tradução geral na célula infectada por meio de fosforilação de rpL10. Isto pode limitar não somente a síntese de proteínas virais, mas também a síntese de proteínas precursoras e essenciais ao ciclo de infecção. Alternativamente ou adicionalmente, a fosforilação da proteína rpL10/QM pode levar à ativação de uma função supressora de tumores que atuaria limitando a proliferação do vírus, por meio de desativação de sinais de crescimento, divisão celular e/ou controle do ciclo celular da planta.



**Figura 8** – Mecanismo proposto para a resposta de defesa mediada por NIK. Nesse modelo a proteína serina/treonina cinase NIK1 se oligomeriza precedendo a fosforilação em trans de seu domínio citoplasmático de cinase que, quando ativado, é capaz de fosforilar substrato(s) endógeno(s) e ativar mecanismo de defesa do hospedeiro que pode culminar em minimização da replicação viral ou do movimento do vírus na planta, impedindo o estabelecimento da infecção sistêmica. A proteína viral NSP interage com o domínio ativo de cinase em uma região responsável pela regulação da atividade cinase da proteína inibindo sua ativação e impedindo a cascata de sinalização celular que culminaria em resposta de defesa antiviral

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belkhadir, Y, Rajagopal, S. Dangl, J. 2004. Plant disease resistance protein signaling:NBS-LRR proteins and their partners. *Curr. Opinion Plant Biol.* 7: 391-399.
- Clark, S.E., Williams, R.W., And Meyerowitz, E.M. 1997. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* 89, 575–585.
- Dievart, A. and Clark, S.E. 2004. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131: 251-261.
- Elmer, J.S.; Brand, L.; Sunter, G.; Gardiner, W.E.; Blisaro, D.M.; Rogers, S.G. 1988.Genetic analysis of Tomato golden mosaic virus II. Requirement for the product of the highly conserved AL1 coding sequence for replication. *Nucleic Acids Research* 16, 7043-7060.
- Fontes, E. P. B.; Luckowand, V. A.; Hanley-Bowdoin, L. 1992. A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *The Plant Cell* 4, 597-608..
- Fontes, E.P.B.; Eagle, P.A.; Sipe, P.S.; Luckow, V.A.; Hanley-Bowdoin, L. 1994a.Geminivirus replication origins have a modular organization. *The Plant Cell* 6, 405-416.
- Fontes, E.P.B.; Gladfelter, H.J.; Schaffer, R.L.; Petty, I.T.D.; Hanley-Bowdoin, L. 1994b.Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. . *J. Biol. Chem.* 269, 8459-8465.
- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F. Waclawovsky, A. J. Chory, J. 2004. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes and Development* .18, 20:2545-2556.
- Florentino, L.H.; Santos, A.A.; Fontenelle, M.R.; Pinheiro, G.L., Zerbini, F.M., Baracat-Pereira; M.C., Fontes; E.P.B. 2006. A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *Journal of Virology.* 80, 13:6648-6656.

- Gong, D.; Gong, Z.; Guo, Y.; Chen, X. Zhu, J.-K. 2002. Biochemical and functional characterization of PCK11, a novel Arabidopsis protein kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 31: 28340-28350.
- Guo, Y., Halfer, U. Ishitani, M and Zhu, JK. 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *The Plant Cell.* 13:1383-1399.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J.P., Hartog, M.V., Schmidt, E.D.L., Boutilier, K., Grossniklaus, U, & de Vries, S.C. 2001. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenesis competence in culture. *Plant Physiol.* 127: 803-816.
- Hubbard, S.R. 1997. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J.* 16, 18:5573-5581.
- Izaurralde, E., Adam, S. 1998. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA*, 4:351-364.
- Jinn, T.L., Stone, J.M., and Walker, J.C. 2000. HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes and Development.* 11: 108-117.
- Johnson, L.N.; Noble, M.E.M. and Owen, D.J. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85: 149-158.
- Katagiri, F. 2004. A global view of defense gene expression regulation- a highly interconnected signaling network. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 7:506-511.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J. 1995. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeat and protein ligands. *Nature* 374: 183-186.
- Kobe B. and Deisenhofer J. 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biol Sci* 19: 415-420.
- Kobe B. and Kajava, A.V. 2001. The leucine-rich repeats as a protein recognition motif. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 725-732.

- Kornev, A.P.; Haste, N.H.; Taylor, S.S. and Eyck, L.F.T. 2006. surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *PNAS*. 103, 47: 17783-17788.
- Kunik, T., Palanichelvan, K., Czosnek, H., Citovsky, V., Gafni, Y. 1997. Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *The Plant Journal*, 13, 3:393.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lazarowitz, S. G, Beachy, R. N. 1999. Viral movement proteins as probes or intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell*, v. 11, p. 535-548.
- Lazarowitz, S.G.; Pinder, A.J.; Damsteegt, V.D.; Rogers, S.G. 1989. Maize streak virus genes essential for systemic spread and symptom development. *The EMBO Journal* 8, 1023–1032.
- Lee, S., Lin, X., Nam N.H., Parang, K. and Sun G. 2003. Determination of the substrate-docking site of protein tyrosine kinase C-terminal Src kinase. *PNAS*. 100, 25:14707-14712.
- Leclerc, D., Merkle, T., Chapdelaine, Y., Hohn, T. CaMV 1999. Gag is implicated in targeting the virion to the nucleus. *Journal of Virology*, v.73.
- Li, J.; Wen, J.; Lease, K.A.; Doke, J.T.; Tax, F.E. and Walker, J.C. 2002. BAK1 an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modules brassinosteroid signalling. *Cell*, 110: 213-222.
- Mariano, A.C.; Andrade, M.O.; Santos, A.A.; Carolino, S.M.B.; Oliveira, M.L.; Baracat-Pereira, M.C.; Bromoshenkel, S.H.; Fontes E.P.B. 2004. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* 318 24-31.
- Mattaj, I.W., Englmeier, L. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annual Review of Biochemistry*, 67,:265–306.
- McGarry, R.C.; Barron, Y.D.; Carvalho, M.F.; Hill, J.E.; Gold, D.; Cheung, E.; Kraus, W.L. and Lazarowitz, S.G. 2003. A novel acetyltransferase interacts with a geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, 15: 1605-1618.

- Murashige, T. E. Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Noueiry, A.O.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76, 965-932.
- Oh, H.S.; Kwon, H.; Sun, S.K. and Yang, C.-H. 2002. QM, a Putative Tumor Suppressor, Regulates Proto-oncogene c-Yes. *J. Biol. Chem.* 277, 39:36489-36498.
- Pascal, E.; Sanderfoot, A.A.; Ward, B.M.; Medville, R., Turgeon, R.; Lazarowitz, S.G. 1994. The geminivirus BR1 Movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *The Plant Cell* 6, 995-1006.
- Rojas, M.R.; Gilbertson, R.L.; Russel, D.R.; Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77, 340-347.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniats, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Sanderfoot, A.A.; Lazarowitz, S.G. 1996. Getting It Together In Plant Virus Movement: Cooperative Interactions Between Bipartite Geminivirus Movement Proteins. *Trends in Cell Biology* 6, 353-358.
- Sanderfoot, A. A.; Ingham, D. J.; Lazarowitz, S. G. 1996 Plant-Microbe And Plant-Insect Interactions: A Viral Movement Protein As A Nuclear Shuttle (The Geminivirus BR1 Movement Protein Contains Domains Essential for Interaction with BL1 and Nuclear Localization). *Plant Physiology*, 110, p.23.
- Schaffer, R. L., Miller, C. G., Petty, I. T. D. 1995. Virus And Hostspecific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology*, v.214, p.330-338.
- Shah, K., Vervoort, J. and de Vries, S.C. 2001. Role of threonines in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation, *J. of Biol. Chem.* 276, 44:41263-41269.
- Sharma, P.L, Rishi, N., Malathi, V. G. 2005. Molecular Cloning of Coat Protein Gene of an Indian Cotton Leaf Curl Virus (CLCuV-HS2) Isolate and its Phylogenetic Relationship with others Members of Geminiviridae. *Virus Genes*, v.30, n.1, p 85-91.

- Shiu, S.H. and Bleecker, A.B. 2001a. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *PNAS*, 98, 19:10763-10768.
- Shiu, S.H. and Bleecker, A.B. 2001b. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function and signaling. *Science's STKE*, [http://www.stke.org/cgi/content/full/OC\\_sigtrans;2001/113/re22](http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2001/113/re22).
- Song, W-Y.; Wang, G-L.; Chen, L-L.; Kim, H-S.; Pi, L-Y, Holsten, T.; Gardner, J.; Wang, B.; Zhai, W-X.; Zhu, L-H.; Fauquet, C. and Ronald, P. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* (Washington, D.C.), 270: 1804-1806.
- Sunter, G.; Hartitz, M.D.; Hormudzi, S.G.; Brough, C. L.; Bisaro, D.M.. 1990. Genetic analysis of Tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for Coat Protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* 179, 69-77.
- Torii, K.U.; Mitsukawa, N.; Oosumi, T.; Matsuura, Y.; Yokoyama, R.; Whittier, R.F. and Komeda, Y. 1996. The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine rich repeats. *Plant Cell*, 8:735-746.
- Trotochaud, A.E.; Hao, T.; Wu, G.; Yang, Z. and Clark, S.E. 1999. The Arabidopsis CLV1 receptor-like kinase requires CLV3 for its assembly into a signalling complex that includes KAPP and Rho GTPase. *Plant Cell*, 11: 393-405.
- Zhang, X.S.; Choi, J.H.; Heinz, J. and Chetty, C. 2006. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR RLK) genes. *J. Mol. Evol.* 63: 612-621.
- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S, Asami, T. and Chory, J. 2005. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell*, 8:855-865.

## **ANEXOS**

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados em ampliações de mutagênese sítio dirigida: gene At5g16000 - NM 121605 - U19075 – NIK1

Mutação	Seqüência	Nome do oligonucleotídeo
473 Gli→Val e 474 Thr→Asp	5'-TGTGACAACCGCGGTTAGAGiCgacGTGGGTCAC-3' 5'-CTCTAACCGCGGTTGTCACATGAGAATCTT-3'	NIK1T1420DSalGVFwd NIK1T1420DSalGVRvs
474 Thr→Glu	5'-TGACAACCGCGGTTAGAGGCGAGGTGGGTCACAT-3' 5'-GCCTCTAACCGCGGTTGTCACATGAGAATC-3'	NIK1T1420Efwd NIK1T1420DRvs
474 Thr→Asp	5'-TGACAACCGCGGTTAGAGGCGATGTGGGTCACAT-3' 5'-GCCTCTAACCGCGGTTGTCACATGAGAATC-3'	NIK1T1420DFwd NIK1T1420DRvs
474 Thr→Ala	5'-TGACAACCGCGGTTAGAGGCGCGGTGGGTCACAT-3' 5'-GCCTCTAACCGCGGTTGTCACATGAGAATC-3'	NIK1T1420Afwd NIK1T1420DRvs
469Thr →Ala	5'- ATCAAGATTTCATGTGACAgCCGCGTTAGA-3' 5'- TGTCACATGAGAATCTTGATGATCCAAGAG-3'	NIK1T1405Afwd NIK1T1405Arvs
468Thr →Ala	5'- AAGATTTCATGTGgCAACCGCGTTAGA-3 5'- CACATGAGAATCTTGATGATCCAAGAG-3'	NIK1T1402A Fwd NIK1T1402A Rvs
469Thr →Ala e 468Thr →Ala	5'- AAGATTTCATGTGgCAgCCGCGTTAGA-3' 5'- CACATGAGAATCTTGATGATCCAAGAG-3'	NIK1T1402/1405 A Fwd NIK1T1402A Rvs
465Ser →Ala	5'- ATCATCAAGATgCTCATGTGACAACC GCGGTTA-3' 5'- ATCTTGATGATCCAAGAGTTTAGCTAAACC-3'	NIK1S1393A Fwd NIK1S1393A Rvs
Deleção 1762	5'- <u>AGAAAGCTGGGT</u> CCTTACTTCTTCTTCAACAACCTC-3' 5'- <u>AGAAAGCTGGGT</u> CCTTAGTCCATCTCCTTCCAGCA – 3'	NBSAtNIK1F-GA (3848) NIK1St1762Rvs-Ga
Deleção 1810	5'- <u>AGAAAGCTGGGT</u> CCTTACTTCTTCTTCAACAACCTC-3' 5'- <u>AGAAAGCTGGGT</u> CCTTACATTTATCCTGTTGCTAC-3'	NBSAtNIK1F-GA (3848) NIK1St1810Rvs-Ga

Bases mutadas estão indicadas em letras minúsculas.

**Tabela 2** - Oligonucleotídeos utilizados para clonagens e experimentos:

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Região de anelamento</b>
AtNIK1FG (3773)	5'- <u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> Aatggagagtactattgtt-3'	Ponto +1 de NIK1
KDAAtNIK1RG (3315)	5'-GAAAGCTGGGTCTCA <u>t</u> cttaggaccagagagctc-3'	Região terminal de NIK1 com stop codon
NBSAtNIK1F-GA (3848)	5'-AAAAAGCAGGCTTCACA <u>A</u> atggagatttggttc-3'	Nucleotídeo 890 de NIK1
KDAAtNIK1FG (3314)	5'- AAAAAGCAGGCTTCACA <u>A</u> atggagctgcaagagg-3'	Nucleotídeo 1243 de NIK1
AtNIK1RGst (4204)	5'- AGAAAGCTGGGTCTCtaggaccagagagctccat-3'	Região terminal de AtNIK1 não contendo stop codon
AtNIK1LP	5'- tgactcaactgcctttctgtaagc -3'	Região flanqueadora direita do T-DNA
AtNIK1RP	5'- tttgtgtgatcgagaaaccgt -3'	Região flanqueadora esquerda do T-DNA
SALK LB1-18	5'- ggcaatcagctgtgtcccgtctcactggtg - 3'	Região interna do T-DNA
ATNIK1 FW	5' - ACCGCGATGTCAAAGCAGCG -3'	Anela na seqüência do mRNA de NIK1
ATNIK1 RV	5' - ATGTGACCCACCGTGCCTCT -3'	Anela na seqüência do mRNA de NIK1
ATACTINAFW	5' - ATGTCGTGAGCCATCCTGTC -3'	Anela na seqüência do mRNA de actina
ATACTINARV	5' - ACACCGGATTCGTGCGGCAT -3'	Anela na seqüência do mRNA de actina
ATHELIC FW	5' - AACAGCCGCTTCGCATGTGT -3'	Anela na seqüência do Mrna de helicase
ATHELIC RW	5' - tgacaggctgcaactgtccg -3'	Anela na seqüência do Mrna de helicase
DONFwd (3397)	5' - tcgcgtaaacgctagcatggatc - 3'	pDONR201
DONRvs (3398)	5' tgtaacatcagagattttgagacac - 3'	pDONR201
MC36 (3408)	5' - tccctcgcaagacccttctc - 3'	Anela no promotor 35S
pK7FGFPRvs (4799)	5' - cgcctcgccctcgccggacac - 3'	Anela na seqüência do gene GFP
DEST15GSTFwd (4798)	5' - ccaatgtgcctggatgcgttc - 3'	Anela na seqüência do gene GST
PCRC1	5' - ctagctgcagcatatttacrarwatgcca - 3'	Anela na região comum do componente B de geminivirus (Rojas <i>et al.</i> , 1993)

PBL1v2040	5' – gcctctgcagcartgrtckatcttcataca – 3'	Anela no nucleotídeo 2040 do componente B de geminivirus (Rojas <i>et al.</i> , 1993)
566CLCVBFBR1v	5' – <u>ggcgtgggtatcttactc</u> - 3'	amplificar gene BR1 (NSP) de CaLCuVB
337CLCVA007F1v	5' - <u>catgccgcctgacaaggtt</u> - 3'	Anela no nucleotídeo 337 do componente A de CaLCuVA.007
1530CLCVA007R1c	<u>5' - ggaaccatggctcctccg</u> - 3'	Anela no nucleotídeo 337 do componente A de CaLCuVA.007
1253CLCVBRBR1c	5' - <u>gacatagcatcggacatcc</u> - 3'	amplificar gene BR1 (NSP) de CaLCuVB
AttB1Fwd	5' –GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'	Complemento da região de recombinação
AttB2 Rvs	5' – GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	Complemento da região de recombinação

- Estão indicadas na tabela as seqüências parciais de recombinação por letras maiúsculas.
- T<sub>m</sub> é em média de 55°C

## SEQUÊNCIAS UTILIZADAS EM MUTAÇÕES DA PROTEÍNA A $\epsilon$ NIK 1

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_01bRun01\_Cp312\_MD1/E  
11.esd 564 MegaBACE  
GST-KDNIK1 com primer 4798 pUFV 648  
GTAAAACGTATCGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGATACTTGAAATCCA  
GCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGG  
TGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTCCATGGTCTGAATC  
AAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACAATGAGGAGATTTGGTCTC  
*AGGGAAGCTTCAGATTGCGACCAATAACTTCAGCAGTAAGAACTTATTGG*  
GGAAAGGTGGCTATGGAAATGTATACAAAGGAATACTTGGAGATAGTACA  
GTGGTTGCAGTGAAAAGGCTTACAAGATGGAGGAGCATTGGGAGGAGAGA  
TTCAGTTATCAGACAGAAGTTGAACATGATCAGTTTCAGCTGTTTCATCGA  
AATCTCTAAGACTCTACGGTTTCTGCATCACACAACTGAGAAGCTTCT  
AGTTTATCCTTATATGTCTAAATGGAAAGCGTAGCATCTCGAATGAAAAG  
CAAAAAACCTGTATCTTTGAACTGGAGCATTACGGAAACGAGGATAAGAC  
CATAGGAAGNCTGG

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_01bRun01\_Cp312\_MD1/E  
12.esd 275 MegaBACE

GST-KDNIK1 com primer 3314F pUFV 648  
TGTATCTCCATCAGCATGTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTCAAAG  
CAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTT  
*GGTTTAGCTAAACTCTTGGATCATCAAGATTCTCATGTGACAACCGCGGT*  
*TAGAGGCACGGTGGGTCACATTGCTCCAGAGATATCTCTCAACTGGTCA*  
*ATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTATTGGCTTCGCGGATTCTTCTTCTTGA*  
GCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTA

[pDO-NIK1G1418V/T1420D](#) primer 3314 [sítio para SalI](#) pUFV 612D

>D04 well D04 consorcio28\_010705 Run01 Cimarron 3.12 488  
CTGTGTATCTCCATGAGCTTAGTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTC  
AAAGCAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATT  
TTGGTTTAGCTAAACTCTTGGATCATCAAGATTCTCATGTGACAACCG  
*CGTTAGAGTCGACGTGGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTCAACTGGT*  
CAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTTCTTGAGCTT  
GTAACCGGACAAAGAGCTTTTGGATTTGGTAAAGCGGCTAACCAGA  
AAGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTCATCAAGAGAAGAACTT  
GAGCTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAAGAGCTACGATGAGATTG  
AGTTAGACGAAATGGTAAGAGTAGCTTTGTTGTGCACACAGTACCTGC  
CAGGACATAGACCAAAAATGTCTGAAGTTGTTTGAATGCTGGAAGGAGAT  
GGACTTGCAGAGAAATGGGAAGCTTCTCAAAGATCA

[pDO-NIK1T1420D](#) primer 3314 pUFV 613C

>D10 well D10 consorcio28\_010705 Run01 Cimarron 3.12 379  
*CCCTGTGTATCTCCCTGAGC***NTG**ATGATCCGAAGATTATCCACCGCGAT  
GTCAAAGCAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGG  
CGATTTTGGTTTAGCTAAACTCTTGGATCATCAAGATTCTCATGTGACAA

CCGCGGTTAGAGGCGATGTGGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTCAACTGGT  
CAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTTCT  
TGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGTAAAGCGGCTAACCAG  
AAAGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTCATCAAGAGAAGAAA  
CTTGAGCTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAAGAGCTACGATGA  
GATTGAGTTAGACGAAATGGTAAGAGTAG

pDO-NIK1T1420E primer 3314 pUFV 614C

>E04 well E04 consorcio28\_010705 Run01 Cimarron 3.12 262

CCCTGTGTTNNTCNTGAGCATTGTGATCCGAAGATTATCACGCGATGTC  
AAAGCAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGA  
TTTTGGTTAGCTAACTCTTGATCATCAAGATTCTCATGTGACAACCG  
CGGTTAGAGGCGAGGTGGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTCAACTGGT  
CAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTTCTTGA  
GCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGTAAAGCGGCTAACCAGA  
AAGGTGTG

pDO-NIK1T1420A primer 3314 pUFV 669B

E05 well E05 consorcio45-271005 Run01 Cimarron 3.12 367

CCGCTTTACGCTCCTTCCGNTCTACATACGCAAGATATCCACCGCGCGTC  
AAGTAGCGAATATACTTCTTAGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGA  
TTGATGGTTTGGCATAACACTCTTGATCACTCAAGATTCTCATGTGAC  
AACCGCGGTTAGAGGCGCGGTGGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTC  
AACTGGTCAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTGGCTTCGGGATTCTT  
CTTCTTGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTNGAGTTTGGTAAAGCG  
GCTAACCAGAAAGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTCNTCAAGA  
GAAGAACTTGAGCTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAAGAGCT  
ACGATGAGATTGAGTTAGACGAAATGGTAAGAGTAGCTTTGT?GTGTGCAC

ACAGTACCTGCCAGTGCACGATAGAACCAAAAATGTCTCGAACGCTTGT

CGACACTGCTGGACAGGAGATGGACTTGCAGAGAACACTGGGAACGCTTC

>C:\Program Files\Amersham

Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_23bRun01\_Cp312\_MD1/C  
09.esd 454 MegaBACE

pDO-NIK1T1405A col 2 primer 3314 Códon mutado para Ala – pUFV 705

ATCTCCATGAAGCAATGTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTCAAAGC  
AGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTTG  
GTTAGCTAACTCTTGATCATCAAGATTCTCATGTGACAGCCGCGGTT  
AGAGGCACGGTGGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTCAACTGGTCAATC  
CTCTGAGAAAACAGATGTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTTCTTGAGCTTG  
TAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGTAAAGCGGCTAACCAGAAAGGT  
GTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTCATCAAGAGAAGAACTTGAGCT  
ACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAAGAGCTACGATGAGATTGAGT  
TAGACGAAATGGTAAGAGTAGCTTTGTTGTGCACACAGTACCTGCCAGGA  
CATA

>C:\Program Files\Amersham

Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_23bRun01\_Cp312\_MD1/C  
12.esd 612 MegaBACE

pDO-NIK1T1402A/T1405A col 3 primer 3314 Códons mutados para Ala pUFV 706

GNAGCATGTGATCCGAAGATATCCACCGCGATGTCAAGCAGCGAATATAC  
TTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTTGGTTTAGCTAAA

CTCTTGGATCATCAAGATTCTCATGTGGCAGCCGCGGTTAGAGGCACGGT  
GGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTCAACTGGTCAATCCTCTGAGAAAA  
CAGATGTTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTAAACTCTTGGATCATCAAGATT  
CTCATGTGGCAGCCGCGGTTAGAGGCACGGTGGGTCACATTGCTCCAGAG  
TATCTCTCAACTGGTCAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTTGGCTTCGG  
GATTCTTCTTCTTGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGTA  
AAGCGGCTAACCAGAAGGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTTCAT  
CAAGAGAAGAACTTGAGCTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAA  
GAGCTACGATGAGATTGAGTTAGACGAAATGGTAAGAGTAGCTTTGTTGT  
GCACACAGTACCTGCCAGGACATAGACCAAAAATGTCTGAAGTTGTTCGA  
ATGCTGGGAAGG

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_10\_26bRun01\_Cp312\_MD1/A  
08.esd 626 MegaBACE  
Template pUFV 610 com oligos NIK1S1393AFwd e Rvs colônia 07 pUFV ???  
ATCCACCGCGATGTCAAAGCAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGA  
AGCTGTGGTTGGCGATTTTGGTTTAGCTAAACTCTTGGATCATCAAGATG  
CTCATGTGACAACCGCGGTTAGAGGCACGGTGGGTCACATTGCTCCAGAG  
TATCTCTCAACGTGGTCAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTTGGCTTCG  
GGATTCTTCTTCTTGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGT  
AAAGCGGCTAACCAGAAAGGTGTGATGCTTGATCTGGGTTAAANAGATTC  
NTCAAGAGAAGAAACCTTGAGCTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTTCGAAGA  
AGAAGAGCTACGATGAGATTGAGTTAGACGAAATGGTAAGAGTACGCTTT  
GTCTGTGCACACAGTACCTGCCAGGCACATAGACCAAAAATGTCTGAAGT  
TGTTTCGACATGCTGGAAGGAGATGGACTTGCAGAGAANCTGGGAAGCTTC  
TCAAGAGATCAGACAGTGTTCAAAATGTAGCAACAGGATAAATGAATTG  
ATGTCATCTTCAGACAGATACTCTGATCTTACCGATGACTCTAGTTTACT  
TGGTGCAAGCAATGGAGCTCTCTGGT

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_10\_04Run01\_Cp312\_MD1/E0  
3.esd 728 MegaBACE  
Ligase 3C: template pUFV 669 com NIK1T1405A Fwd e Rvs. pUFV729  
CTTGTGTATCTCCATGAAGCTNTTGTGATCCGAAGATTATCCACCGCGAT  
GTCAAAGCACGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTG  
GCGATTTTGGTTTAGCTAAACTCTTGGATCATCAAGATTCTCATGTGACA  
GCCGCGGTTAGAGGCAGCGGTTGGGTCACATTGCTCCAGAGTATCTCTCAA  
CTGGTCAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTT  
CTTGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGTAAAGCGGCTAA  
CCAGAAAGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTCATCAAGGAGAAG  
AACTTGAGCTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAAGAGCTACGA  
TGAGATTCGAGTTAGACGAAATGGTNNAGAGTAGCTTATGTTGTGCACAC  
AGTACCTGCCAGGACATAGACCAAAAATGTCTCGAAGTTGTTTCGAATGC  
TGGAAGGACGATGGACTTGCAGAGAAATGGGAAGCTTCTCAAAGATCAGA  
CAGTGTTCAAAATGTAGCAACAGGATAAATGAATTGATGTCATCTTCAG  
ACAGATACTCTGATCTTACCGATGACTCTAGTTAACTTGTGCAAGCAATG  
GAGCTCTCTGGTCTTAGAATGAGACACCAGACTTTCTTGTACAAAGTTGG  
CATTATAAAGAAAGCATTGGCTTATCCA

>C:\ProgramFiles\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_04\_03Run01\_Cp312\_MD1/H0  
8.esd 413 MegaBACE

pUFV 669 primer 3314 NIK 1T1402AFwd E Rvs colônia 01 pUFV 715  
TGNTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTCAAAGCAGCGAATATACTTCTTG  
ATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTTGGTTTAGCTAAACTCTTGGAT  
CATCAAGATTCTCATGTGCAACCGCGGTTAGAGGGCGGTGGGTCACATTG  
CTCCAGAGTATCTCTCAACTGGTCAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTATGG  
CTTCGGGATTCTTCTTCTTGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTNG  
GTAAAGCGGCTAACCAGAAAGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAACAAGATTC  
ATCAAGAGAAGAACTTGAGCTACTTGTGGATAAACGAGTTGTCGAAGAAGA  
AGAGCTACGATGAGATTGAGTTAGACGAACATGGTAAGAGTAGCT

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_04\_03Run01\_Cp312\_MD1/HO  
8.esd 413 MegaBACE

pUFV 669 com primers NIK 1T1402AFwd E Rvs colônia 01 pUFV 716  
TGNTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTCAAAGCAGCGAATATACTTCTTG  
ATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTTGGTTTAGCTAAACTCTTGGAT  
CATCAAGATTCTCATGTGCAACCGCGGTTAGAGGGCGGTGGGTCACATTG  
CTCCAGAGTATCTCTCAACTGGTCAATCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTATGG  
CTTCGGGATTCTTCTTCTTGAGCTTGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTNG  
GTAAAGCGGCTAACCAGAAAGGTGTGATGCTTGATTGGGTTAAACAAGATTC  
ATCAAGAGAAGAACTTGAGCTACTTGTGGATAAACGAGTTGTCGAAGAAGA  
AGAGCTACGATGAGATTGAGTTAGACGAACATGGTAAGAGTAGCT

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_01aRun01\_Cp312\_MD1/F03.esd  
265 MegaBACE pUFV 688 com 3314F  
NTGGTAGAGTGGCGACCAATCCTCCAAAAATCAGGATCTAGGTTCCGCGT  
CCAATGGTTCGAATCAAACCAAGTTTGTACAAAAAGCAAGCGCTTCCAC  
AATGAGGAGATTTGGTTTCAGGGAGCTTCAAGATTGCGACCAAAT  
AACTTCAGCAGTNAAGAACTTAATTGGCGGAAAGGTATGGCTATCGCGAC  
ACATAGTNATAACCAAGGCAATCACTTGGAGAATAGTAACAGTAGGTTAG  
CAGTCAACACAGGC

>C:\Program Files\Amersham  
Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_01aRun01\_Cp312\_MD1/F  
04.esd 829 MegaBACE pUFV 688 com 3314F  
GTATCTCCATGAGCAATGTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTCAAAG  
CAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTT  
GGTTTAGCTAAACTCTTGGATCATCAAGATTCTCATGTGACAACCGCGGT  
TAGAGGCACGGTGGGTCACATTGCTCCAGCAGTATCTCTCAACTGGTCAA  
TCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTTCTTGAGCT  
TGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGAGTTTGGTAAAGCGGCTAACCAGAAAG  
GTGTGATGCTTGATTGGGTTAAAAAGATTCATCAAGAGAAGAACTTGAG  
CTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAGAGCTACGATGAGATTGA  
GTTAGACGAAATGGTAAGAGTAGCTTTGTTGTGCACACAGTACCTGCCAG  
GACATAGACCAAAAATGTCTGAAGTTGTTTGAATGCTGGAAGGAGATGGA  
CTTGACAGAGAAATGGGAAGCTTCTCAAAGATCAGACAGTGTTCAAAATG  
TAGCAACAGGATAAATGTAAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTTATG  
ATTCGACCCGGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTG  
GCTGCTGCCACCGTGAGCAATACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC  
GGGTCTTGAGGGGTNATTTGCTCGAACAGGAGGAAGTATATCCGGATATC

CACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGGATCGCGTAGTCGATAGTTGGCTCCA  
AGTAGCCGAAGCGAAGCAGGACTTGGGGC

>C:\Program Files\Amersham

Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_01aRun01\_Cp312\_MD1/F  
05.esd 523 MegaBACE pUFV 689 com 4798F

TTGTTAAAAACGTATTGCNGCTATCCCTACAAATTGATAAGTACTTGAAA  
TCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGG  
TGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTCCATGGTCTGA  
ATCAAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACAATGAGGAGATTTGGT  
TTCAGGGAGCTTCAGATTGCGACCAATAACTTCAGCAGTAAGAACTTATT  
GGGGAAAGGTGGCTATGGAAATGTATACAAAGGAATACTTGGAGATAGTA  
CAGTGGTTGCAGTGAAAAGGCTTAAAGATGGAGGAGCATTGGGAGGAGAG  
ATTCAGTTTCAGACAGAAGTTGAAATGATCAGTTTAGCTGTTTCATCGAAA  
TCTCTTAAGACTCTACGGTTTCTGCATCACACAACTGAGAAGCTTCTAG  
GTTTATCCTTATATGTCTAATGGAAGCGTTGCATCTCGAATGAAGGCAAA  
ACCTGTCTTGAAGTTGGGAAGCCC

>C:\Program Files\Amersham

Biosciences\MegaBACE\AnalyzedData\Placa\_mix\_2006\_02\_01aRun01\_Cp312\_MD1/F  
07.esd 829 MegaBACE pUFV 689 com 3314F

GTATCTCCATGAGCAATGTGATCCGAAGATTATCCACCGCGATGTCAAAG  
CAGCGAATATACTTCTTGATGACTACTGTGAAGCTGTGGTTGGCGATTTT  
GGTTTAGCTAAACTCTTGATCATCAAGATTCTCATGTGACAACCGCGGT  
TAGAGGCACGGTGGGTCACATTGCTCCAGCAGTATCTCTCAACTGGTCAA  
TCCTCTGAGAAAACAGATGTTTTTGGCTTCGGGATTCTTCTTCTTGAGCT  
TGTAACCGGACAAAGAGCTTTTGGATTTGGTAAAGCGGCTAACCAGAAAG  
GTGTGATGCTTGATTGGGTAAAAAGATTCATCAAGAGAAGAACTTGAG  
CTACTTGTGGATAAAGAGTTGTTGAAGAAGAAGAGCTACGATGAGATTGA  
GTTAGACGAAATGGTAAGAGTAGCTTTGTTGTGCACACAGTACCTGCCAG  
GACATAGACCAAAAATGTCTGAAGTTGTTTCGAATGCTGGAAGGAGATGGA  
CTAAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTTATG  
ATTCGACCCGGGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTG  
GCTGCTGCCACCGTGAGCAA

Seqüência do primer está indicada por grifo. Códon mutado em lilás. Nome do clone contendo o cDNA da proteína inteira contendo mutação indicado para cada seqüenciamento (pUFV...) está indicado para cada seqüência. Códon de início e parada de tradução em laranja.