

KÊNIA VIÇOSO GOMES LOPES

**VIAS DE SINALIZAÇÃO DE DEFESA CONTRA VÍRUS
MEDIADA PELO RECEPTOR IMUNE NIK1 (NSP-
INTERACTING KINASE)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L864v
2012

Lopes, Kênia Viçoso Gomes, 1976-
Vias de sinalização de defesa contra vírus mediada pelo
receptor imune NIK1 (NSP-Interacting Kinase) / Kênia
Viçoso Gomes Lopes. – Viçosa, MG, 2012.
vi, 111f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Comunicação celular. 2. Vírus de plantas. 3. Viroses.
4. Transdução de sinal celular. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 571.6

KÊNIA VIÇOSO GOMES LOPES

**VIAS DE SINALIZAÇÃO DE DEFESA CONTRA VÍRUS
MEDIADA PELO RECEPTOR IMUNE NIK1 (NSP-
INTERACTING KINASE)**

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

APROVADA: 30 de julho de 2012.

Anésia Aparecida dos Santos

Angélica Pataro Reis

Humberto Josué de Oliveira Ramos

Juliana Rocha Lopes Soares Ramos

Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

*Aos meus pais José Teodoro e
Araci, e aos meus amores Iara e
Gelson.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado força e tranquilidade para conseguir chegar até aqui e a São Jorge, que nas horas de dificuldades, sempre abriu meus caminhos.

Aos meus pais José Teodoro e Araci, sempre carinhosos e exemplos de vida, por me apoiarem e me oferecerem conforto emocional.

Aos amores de minha vida Iarinha e Gelson. Ela, minha querida filhinha sempre alegre e inteligente. Ele, meu alicerce desde que entrou em minha vida. Tenho muito orgulho de vocês!

À Universidade Federal de Viçosa, por ter me oferecido todas as oportunidades de estudo durante minha vida acadêmica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À professora Elizabeth, por ter me aceitado como parte de sua equipe profissional, por ter acreditado em minha capacidade e pelo exemplo de trabalho, disciplina e amor a ciência.

Às minhas queridas amigas e companheiras Anésia e professora Angélica pela amizade, dedicação ao trabalho, conselhos e por toda ajuda nos experimentos realizados.

Aos professores Humberto e Ju Ramos pela grande amizade, ajuda e pelos momentos de descontração que sempre ocorrem quando o casal está presente.

Aos grandes amigos Giselle, Rafa, Pedro, Cris, João Paulo, Iara, Humbertinho, Mayaninha, Fábria, Danizinha, Pato, Mônica, Wellinson, Michi, irmãos Marcos e Lucas, Pri, Ana Clara, Elisa, Kelly pelos momentos de alegria e

apoio em qualquer dificuldade. Muito obrigada pelos quatro anos de convívio saudável, cheios de trabalho, risos e companheirismo.

Ao secretário da pós-graduação do departamento de Bioquímica, Dudu, pela amizade, carinho e presteza em ajudar.

À Marlene e à Gláucia pela grande colaboração, pelo constante sorriso no rosto ao ajudar e pelo exemplo de boa educação e gentileza.

E a todos que, de alguma forma, participaram de minha vida acadêmica e profissional durante o período do meu doutorado possibilitando que ele fosse concluído.

RESUMO

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Vias de sinalização de defesa contra vírus mediada pelo receptor imune NIK1 (NSP-Interacting Kinase)**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto e Sebastião Tavares Rezende.

NIK (NSP-Interacting Kinase) é uma serina/treonina cinase que pertence a subfamília de receptores com repetições ricas em leucina que inclui membros envolvidos em mecanismos de desenvolvimento e defesa em plantas. NIK foi primeiramente identificado pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP (nuclear shuttle protein) de geminivírus e tem sido apontada como um componente do sistema de defesa de plantas contra o ataque de geminivírus. Pesquisas recentes corroboram com sua função em transduzir um sinal de defesa em resposta a infecção viral e indicam componentes da via de sinalização antiviral mediada por NIK. Este trabalho descreve o papel de NIK como um transdutor de uma nova via de defesa inata de plantas, apresenta novos dados da função de NIK e discute seu possível envolvimento no desenvolvimento das plantas.

ABSTRACT

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012.
Signaling pathways of defense against virus mediated by immune receptor NIK1 (NSP-Interacting Kinase). Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Sebastião Tavares Rezende.

The NSP-interacting kinase, NIK, belongs to the five leucine-rich repeats-containing receptor-like serine/threonine kinase subfamily that includes members involved in plant development and defense. NIK was first identified by its capacity to interact with the geminivirus nuclear shuttle protein (NSP) and has been strongly associated with plant defense against geminivirus. Recent research corroborate its function in transducing a defense signal against virus infection and describe components of NIK-mediated antiviral signaling pathway. This study describes the NIK role as a transducer of a novel layer of plant innate defense, presents new data on NIK function and discusses its possible involvement in plant development.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas	10
2 - ESTRUTURAÇÃO DA TESE	15
3 - CAPÍTULO I: NSP-Interacting Kinase, NIK: A Transducer of Plant Defense Signaling.....	16
Abstract.....	17
NIKs (NSP-interacting kinases): a functionally redundant branch of the LRR-RLK-II subfamily in counteracting virus infection	18
Components of the NIK-mediated signaling pathway.....	19
NIK as a kinase receptor	20
Possible mechanisms of NIK activation	21
NIK mediated antiviral signaling pathway	23
Are NIK-like and SERK-like receptors functionally redundant?	25
Conclusion	26
Supplementary data	27
Acknowledgements	27
References	28
4 - CAPÍTULO II: Modulação da Atividade de NIK1 para Tolerância a Begomovirus em Arabidopsis	35
Resumo	36
Abstract	38
I - Introdução	40
II- Materias e Métodos	45
1 - Construções de DNA	45
2 - Material vegetal, condições de crescimento e transformação de plantas	46
3 - Extração de RNA total das plantas	46
4 - Análise da expressão por RT-PCR e qRT-PCR	47
5 - Método de sequenciamento de RNA e análise dos dados	48
6 - Imunoprecipitação	49
7 - Determinação dos teores de clorofila	50
8 - Marcação <i>in vivo</i> de proteínas das folhas de Arabidopsis	50
9 - Ensaios de coloração	51
9.1 - Detecção de H ₂ O ₂ por DAB (Diaminobenzidina).....	51
9.2 - Detecção de morte celular por Azul de Tripán	51
9.3 - Detecção de morte celular por azul de Evans	51

10 - Infecção de Arabidopsis com CaLCuV e ensaios de Infectividade	51
11 - Diagnóstico molecular da infecção viral	52
11.1 - Extração de DNA das plantas e confirmação por PCR	52
11.2 - Análises dos dados do ensaio de infecção	53
III - Resultados	54
1 - Caracterização molecular das plantas transgênicas expressando T474D	54
2 - Superexpressão de NIK1-T474D em Arabidopsis causa impacto negativo no desenvolvimento das plantas transgênicas.....	56
3 - Regulação negativa da tradução global pela expressão ectópica do mutante T474D em Arabidopsis	58
4 - Expressão ectópica de T474D induz a superexpressão de genes do sistema imune e um fenótipo de morte celular em plantas transgênicas	61
5 - Expressão ectópica de NIK1 T474D em Arabidopsis confere tolerância ao begomovírus CaLCuV	64
6 - O receptor de defesa imune NIK é amplamente distribuído no Reino vegetal	67
IV – Discussão	69
V - Referências Bibliográficas	74
VI – Anexos	81
5 - CAPÍTULO III: Atividade de Fosforilação de NIK1 (NSP-Interacting Kinase)	83
Resumo	84
Abstract	86
I - Introdução	88
II - Materias e Métodos	92
1 - Construções de cDNA transformação	92
2 - Expressão heteróloga em <i>E. coli</i> e purificação de proteínas recombinantes	92
2.1 - Preparo das células competentes e de <i>E. coli</i> BL21:DE3 (pLYSs)	92
2.2 - Indução da expressão das proteínas fusionadas a pGST em <i>E. coli</i>	93
2.3 - Purificação e quantificação das proteínas recombinantes	93

3 - Ensaio de atividade de cinase	94
4 - Ensaio de fosforilação usando peptídeo sintético	95
III - Resultados e Conclusões	96
1 - Expressão em <i>E. coli</i> e purificação das proteínas L10 e KDNIK1 fusionadas a GST	96
2 - Curva padrão do ADP e curva do tempo	97
3 - A proteína rpL10A não é substrato de NIK1 <i>in vitro</i>	100
IV - Referências Bibliográficas	105
6 - CONCLUSÕES GERAIS	110

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O receptor transmembrana NIK (NSP-Interacting Kinase) foi inicialmente identificado como um alvo de virulência da proteína NSP (Nuclear Shuttle Protein) de begomovírus (Mariano *et al.*, 2004; Fontes *et al.*, 2004), sendo um componente do sistema imune de plantas (Carvalho *et al.*, 2008). NSP atua como inibidor das atividades de autofosforilação e fosforilação de NIK1 e, portanto, acredita-se que essa proteína viral interfere nas vias de defesa contra patógenos mediadas por NIK1 em plantas (Fontes *et al.*, 2004). Os begomovírus bissegmentados, cujo genoma codifica a proteína NSP, aumentam a patogenicidade em hospedeiros permissíveis através do efeito supressor de NSP sobre NIK. Dada a relevância de begomovírus como um dos maiores e mais bem sucedidos vírus de plantas, causando severas perdas em diversas culturas cultiváveis e vegetais, existe um interesse crescente no desenvolvimento de plantas superiores resistentes ao vírus. Uma alternativa que tem sido considerada é a manipulação da via de defesa antiviral mediada pelo receptor NIK e de sua interação com a proteína viral NSP.

Os begomovírus são vírus de plantas que possuem o genoma constituído de uma ou duas moléculas circulares de DNA fita simples (2.6 a 3.0 kb). O gênero Begomovírus (membro típico: *Bean golden yellow mosaic vírus*) é o maior grupo dentro da família *Geminiviridae*. É considerado um dos gêneros de maior importância econômica por causar enormes perdas em culturas como algodão, feijão, milho, mandioca, pimenta e tomate (Brown, 1992; Polston *et al.*, 1994; Moriones & Navas-Castilho, 2000). São vírus transmitidos pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e infectam somente plantas dicotiledôneas (Stanley *et al.*, 2005).

Os begomovírus bissegmentados possuem dois componentes genômicos, DNA A e DNA B. O DNA A contém os genes cujos produtos protéicos estão envolvidos com os mecanismos de replicação, ativação da transcrição, encapsidação da progênie viral e supressão de funções de defesa por RNAi (Timmermans *et al.*, 1994; Vanitharani *et al.*, 2005). O DNA B contém os genes requeridos para o movimento célula-a-célula e a longa distância, gama de

hospedeiros e desenvolvimento de sintomas (Timmermans *et al.*, 1994). Ambos os componentes são necessários para a infecção sistêmica de plantas. Exceto por uma estrutura em forma de grampo e por uma sequência de aproximadamente 200 nucleotídeos denominada região comum, os dois componentes não apresentam similaridade significativa em suas seqüências de nucleotídeos (Fonte *et al.*, 1994a, b).

O DNA A contém o gene da capa protéica (ORF AV1, gene *CP* - coat protein) e três genes no sentido complementar (ORFs AC1, AC2 e AC3) correspondentes aos genes: *Rep* que codifica uma proteína associada à replicação, *TrAP* (transactivation protein) que é um fator de transcrição de genes virais e *REn* que é um fator de amplificação da replicação viral. Embora o gene *REn* não seja essencial para que a replicação ocorra, ele é responsável por um maior acúmulo de DNA viral quando é expresso (Brough *et al.*, 1992).

O DNA B possui as ORFs BV1 e BC1 correspondentes aos genes *NSP* e *MP*, respectivamente (Palmer & Rybicki, 1998). Esses dois genes atuam em conjunto para promover a difusão do vírus na planta hospedeira estabelecendo uma infecção sistêmica. BV1 codifica a proteína NSP (Nuclear Shuttle Protein) que possibilita a movimentação do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma da célula vegetal. BC1 expressa a proteína MP (Movement Protein) que é responsável pelo transporte do complexo NSP-DNA viral de uma célula a outra através dos plasmodesmos e a longa distância, via floema (Rojas *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Jeske, 2001). A inativação desses dois genes por mutações não afeta a replicação do genoma viral, mas promove a incapacidade do vírus de infectar plantas evidenciando que NSP e MP controlam a patogenicidade viral e o movimento sistêmico do vírus.

O sucesso do estabelecimento da infecção viral depende do transporte das partículas virais do núcleo para o citoplasma e vice-versa. Sendo assim, devido à importante função desempenhada por NSP no transporte intracelular do DNA viral nas células vegetais, acredita-se que NSP interaja com proteínas do hospedeiro nos diversos compartimentos celulares. Mariano *et al.* (2004) isolaram em plantas de tomate um receptor transmembrana pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP sendo, por isso, designado LeNIK (*Lycopersicon esculentum*

NSP-Interacting Kinase). Além disso, homólogos desse receptor em soja (*Glycine max* NSP-Interacting Kinase - GmNIK; Mariano *et al.*, 2004) e em *Arabidopsis thaliana* (AtNIKs; Fontes *et al.*, 2004) também demonstraram capacidade de interagir com NSP. Em *Arabidopsis*, NIK atua como receptor transmembrana de uma via de sinalização antiviral (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). A interação de NSP com o domínio cinase de NIK *in vitro* inibe sua atividade de autofosforilação e fosforilação de substratos sugerindo o envolvimento de NIK em vias de resposta de defesa antiviral (Fontes *et al.*, 2004).

O receptor NIK é um receptor do tipo serina/treonina cinase (Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004). Os receptores cinases (RK - Receptor Kinase) são encontrados em plantas e metazoários. Um RK típico é formado basicamente por um domínio extracelular na sua porção amino-terminal que reconhece moléculas ligantes de forma específica, seguido por uma região transmembrana e por um domínio cinase citoplasmático na porção carbóxi-terminal relacionado à transdução de sinais (Walker, 1994; Pawson & Nash, 2000; Morillo & Tax, 2006; Afzal *et al.*, 2008).

Duas classes de RKs são encontradas em animais: receptores tirosina-cinases (RTKs), que fosforilam resíduos de tirosina e receptores serina/treonina-cinases (RSTKs), que fosforilam resíduos de serina e/ou treonina em seus substratos-alvos. O receptor serina/treonina-cinase mais conhecido é o TGF- β (Factor Growth Transforming) que é formado por um complexo heterodimérico de dois receptores diferentes. O receptor tipo II (receptor primário) liga-se a um ligante e isso acarreta a fosforilação do receptor tipo I (transdutor), o qual não tem a capacidade de interagir diretamente com a molécula ligante que iniciou o processo de ativação. A fosforilação do transdutor permite que os eventos “downstream” da cascata de sinalização tenham sequência (Massagué, 1998).

A classe de receptores tirosina-cinases, que é a mais comum em animais, é representada por uma gama de receptores que atuam como homodímeros ou heterodímeros. Esses dímeros são formados por dois RTKs relacionados. A autofosforilação do *loop* de ativação do domínio cinase intracelular desses receptores resulta na sua atividade de cinase que permite a fosforilação de resíduos de tirosina no substrato-alvo gerando sítios para recrutar componentes

“downstream” da via, que também podem ser ativados por fosforilações subseqüentes (Hubbard & Till, 2000).

Em plantas, a primeira proteína cinase foi clonada a vinte e dois anos atrás por Walker & Zhang (1990). Essa proteína, proveniente do genoma do milho (*Zea mays*), apresentou características estruturais semelhantes as dos receptores tirosina-cinases de animais. A partir do seqüenciamento completo do genoma de várias plantas, pôde-se verificar que plantas podem expressar um grande número de proteínas com topologias típicas de receptores cinases. Tais proteínas são referidas, portanto, como RLKs (Receptors Like Kinases - Becraft, 1998).

Apesar das RLKs formarem uma família de cinases-transmembrana caracterizadas por apresentar uma estrutura típica parecida aos receptores tirosina-cinases de animais (Walker, 1994), em plantas ocorre à prevalência massiva de receptores do tipo serina/treonina-cinase. Como exceção, pode-se citar os receptores histidino-cinases ETR1 relacionados a via de sinalização do etileno (Bleeker & Kende, 2000).

Em contraste ao grande número de seqüências de RLKs que vem sendo elucidadas, pouco se sabe a respeito de suas características funcionais. Os membros que já tiveram funções definidas mostraram estar envolvidos em diversos tipos de processos. Dentre estes se destacam RLKs relacionadas ao desenvolvimento da planta, como os genes *CLAVATA1 (CLV1)* e *ERECTA* que determinam a forma e o tamanho do órgão floral em *Arabidopsis* (Torii *et al.* 1996; Clark *et al.* 1997); o *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 (BRI1)* que participa do desenvolvimento da planta pela percepção do hormônio brassinosteróide (Li & Chory, 1997) e a proteína *SERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1)* que participa da formação de células embriogênicas e também está presente no complexo protéico contendo BRI1, sugerindo que SERK1 também participa da via de sinalização de brassinosteróide (Hecht *et al.* 2001).

RLKs também já foram relacionados a mecanismos de resistência a patógenos como o receptor XA21 envolvido na resistência do arroz a ferrugem bacteriana (Song *et al.*, 1995), FLS2 que é responsável pela percepção da flagelina

bacteriana em *Arabidopsis* (Gomez-Gomez & Boller, 2002) e o receptor NIK que é um componente do sistema de defesa anti-viral de plantas (Fontes *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). Outros RLKs como FERONIA, THESEUS e WAK2 estão implicados em processos de adesão, biogênese e integridade da parede celular (Hematy *et al.*, 2007; Seifert & Blaukopf, 2010). Também já foram identificados membros envolvidos no fenômeno de nodulação em plantas como os receptores SYMRK e NORK (Endre *et al.*, 2002; Strake *et al.*, 2002).

Os domínios extracelulares de RLKs exibem uma grande variedade em suas identidades de seqüência e organização. Através desses domínios, os RLKs reconhecem e interagem de forma específica com os mais diferentes ligantes que podem ser proteínas, polissacarídeos ou lipídeos (Shiu & Bleeker, 2001a, Lehti-Shiu, 2009).

A família RLK constitui a maior família gênica em *Arabidopsis* (610 membros) e em arroz (1.100 membros) (Shiu & Bleeker 2001a; 2001b; 2003; Shiu *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, apesar da grande maioria dos membros identificados apresentarem topologia típica de receptor transmembrana, outros não apresentam essa estrutura devido à ausência da seqüência-sinal e/ou da região transmembrana. Algumas dessas cinases citoplasmáticas formam subfamílias únicas, enquanto outras são mais relacionadas à cinases do tipo-receptor. Sendo assim, RLKs de plantas incluem receptores-cinases e cinases que não possuem a configuração clássica de receptor, sendo todos coletivamente denominados “família RLK” (Shiu & Bleeker, 2001b).

Shiu & Bleeker, (2001) reportaram que não existe homólogos de RLKs no genoma de leveduras e que, em modelos animais avaliados, existem apenas 5 genes homólogos, sendo eles: Pelle-cinase (CePelle) em *Caenorhabditis elegans*, Pelle-cinase (DmPelle) em *Drosophila melanogaster* e três receptores interleucina associados a cinases (IRAKs) em humanos. A relação filogenética entre RLKs e Pelle/IRAKs indica que esses genes são ortólogos derivados de uma cinase ancestral presente num antepassado comum a plantas e animais. Assim, essas cinases relacionadas são coletivamente classificadas como membros da família RLK/Pelle.

A análise de genomas de eucariotos disponíveis no GenBank evidenciou que a família RLK/Pelle sofreu uma grande expansão somente em plantas apresentando apenas poucos membros em protistas (um exemplar em *Plasmodium*) e animais (um exemplar em *Drosophila* e quatro em humanos). Essa família começou a expandir em épocas muito remotas em plantas terrestres, uma vez que foi detectado 329 RLK/Pelle em Briófitas. De qualquer forma, a presença desses receptores em *Chlamydomonas reinhardtii* e em humanos sugere uma origem ancestral comum para a família RLK/Pelle (Shiu & Beecker, 2003; Lenthi-Shiu *et al.*, 2009). Além disso, essas investigações mostraram que as subfamílias que alcançaram maior expansão individual são aquelas que apresentam alguns membros com conhecidas funções em mecanismos de resistência, sugerindo que sua rápida expansão foi provavelmente uma consequência da adaptação impulsionada pela rápida evolução de patógenos (Lenthi-Shiu *et al.*, 2009).

Acredita-se que a expansão gênica das RLKs/Pelle, que ocorreu apenas em plantas, tenha sido consequência de duplicações seqüenciais de genes RLKs nos cromossomos e também devido ao fenômeno de duplicação em larga escala do genoma total da célula (Shiu & Beecker, 2001a; 2001b; 2003; Lenthi-Shiu *et al.* 2009). A duplicação de genes ocorre numa taxa relativamente alta em eucariotos, mas a grande maioria dos genes duplicados é perdida dentro de poucos milhões de anos (Lynch & Conery, 2000). A maior parte das famílias gênicas nos organismos é pequena, sendo que a presença de famílias grandes, como a RPK/Pelle, constitui uma exceção.

Portanto, é interessante se considerar porque a seleção natural favoreceu a retenção desses genes duplicados em plantas. Uma possível explicação para essa observação é que as duplicações sucessivas dos genes dessa família foram sendo rapidamente estabelecidas no genoma para assumir novas funções (neofuncionalização). Considerando os papéis desempenhados por RLKs no desenvolvimento das plantas, as duplicações em RLKs/Pelle devem ter sido retidas por causa das regulações adicionais em processos como diferenciação de tecidos, promovendo sistemas de controle necessários para o desenvolvimento de organismos multicelulares mais complexos (Shiu & Bleecker, 2003).

Subsequentemente, esses genes podem ter sido retidos pela sua contribuição no reconhecimento de novas moléculas provenientes de patógenos ou organismos simbioses. Estudos adicionais relacionados às funções desempenhadas pelos membros dessa família em plantas, juntamente com estudos de genômica comparativa, poderão gerar novas e importantes informações a respeito da história evolucionária dessa complexa família de receptores (Shiu & Bleeker, 2003).

Receptores like-cinases com domínios ricos em repetições de leucina (RLK-LRR-like) formam o grupo mais numeroso de receptores transmembrana. Em *Arabidopsis*, mais da metade dos genes RLKs codificam receptores LRR que são subdivididos em 13 subfamílias (LRR I a XIII), de acordo com a organização do domínio (Dievart & Clark, 2004) e pelo número de cópias e arranjo das repetições ricas em leucina no motivo extracelular (Zhang *et al.*, 2006). Esses domínios extracelulares são caracterizados pela seqüência consenso LxxLxLxxNxLxx (sendo que x = qualquer resíduo de aminoácido) havendo pouca similaridade de seqüência fora dessa região (Braun & Walker, 1996). São constituídos por 3 a 26 motivos LRR que estão envolvidos diretamente em interações proteína-proteína exclusivamente em plantas (Kobe & Deisenhofer, 1994; Zhang *et al.*, 2006).

O receptor NIK de *Arabidopsis* é um RLK pertencente à subfamília com repetições ricas em leucina (LRR)-II (Shiu & Bleeker, 2001). Essa subfamília é formada por 14 proteínas, cujo domínio extracelular característico é formado por 5 repetições ricas em leucina que formam um bloco contínuo único. Quatro dessas repetições são consideradas completas contendo 24 resíduos de aminoácidos e a quinta repetição é incompleta, sendo formada por apenas 16 resíduos (Zhang *et al.*, 2006).

A partir de análises filogenética, os membros da subfamília LRR II-RLK foram divididos em 3 grupos: (i) proteínas de defesa; (ii) proteínas relacionadas ao desenvolvimento e (iii) proteínas com funções desconhecidas. O receptor SERK de *Arabidopsis* faz parte do grupo de proteínas ligadas ao desenvolvimento e os receptores NIK1 (At5g16000), NIK2 (At3g25560) e NIK3 (At1g60800) estão inseridos no grupo formado por proteínas de defesa (Zhang *et al.*, 2006).

Visando elucidar componentes “downstreams” presentes na via de sinalização mediada por NIK, foi identificada a proteína ribossomal rpL10A como possível substrato que interage com NIK (Rocha *et al.*, 2008). A interação entre L10A e NIK promove a translocação de L10A para o núcleo das células onde, provavelmente, irá atuar na ativação ou repressão de genes, possivelmente envolvidos na via de resposta à infecção por geminivírus. De fato, o fenótipo de susceptibilidade aumentada à infecção por geminivírus observado em linhagens nocautes de *Arabidopsis* para o gene *nik* e *L10A* corrobora a afirmação de que essas duas proteínas atuam numa mesma via de sinalização (Carvalho *et al.*, 2008).

NSP inibe a atividade de NIK por se ligar a uma região do domínio cinase da enzima que abrange a alça de ativação (A-loop) e o sítio ativo da enzima (Fontes *et al.*, 2004). A fosforilação de resíduos de treonina ou tirosina no A-loop constitui um mecanismo regulatório de ativação comum a muitas proteínas cinases e, em alguns casos, também afeta a interação com substratos (Johnson *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 2001; Zhang & Klessig, 2001; Adams, 2003; Nolen *et al.*, 2004). Sendo assim, a formação do complexo NSP-NIK modula o estado de fosforilação da enzima e, por consequência, a ativação da cinase (Santos *et al.*, 2009).

Particularmente no caso de NIK1 de *Arabidopsis*, a fosforilação do resíduo treonina na posição 474, presente no A-loop, é crucial para ativação da cinase (Santos *et al.*, 2009). De fato, a substituição da treonina 474 por um resíduo de aspartato (que mimetiza o estado da enzima constantemente ativado) resulta em uma mutação de ganho de função. O receptor mutado T474D possui atividade de autofosforilação superior à proteína NIK1 normal, além de não ser inibido pela proteína NSP de geminivírus. Ademais, esse mutante constantemente ativo de NIK provou ser mais efetivo em realocar L10A para o núcleo das células vegetais quando essas duas proteínas são expressas em folhas de tabaco (Carvalho *et al.*, 2008).

O modelo atual que ilustra a via de sinalização antiviral mediada por NIK propõe que quando uma célula vegetal é infectada por geminivírus, o domínio extracelular LRR de um receptor NIK sofre oligomerização com o domínio LRR

de outro receptor permitindo a aproximação dos respectivos domínios cinases. A transfosforilação da treonina 474 presente no A-loop ativa os receptores NIK. Essa ativação dependente de fosforilação permite a interação de NIK com o componente “downstream” da via, a proteína ribossomal L10A, cuja localização é nucleoplasmática (Carvalho *et al.*, 2008). Após interação com NIK, L10A é realocada para o núcleo das células onde, provavelmente, irá moldar uma resposta de defesa contra a infecção imposta. Agindo contra esse mecanismo, NSP se liga ao domínio cinase de NIK impedindo a oligomerização e a transfosforilação da treonina 474 desse receptor. Como consequência, L10A é mantida no citoplasma da célula durante a infecção (Carvalho *et al.*, 2008). Assim, por suprimir a atividade de cinase de NIK, NSP estabelece um ambiente mais favorável à infecção viral (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009, 2010).

Devido a importância da via de sinalização mediada por NIK é objetivo geral dessa tese a caracterização *in vivo* da modulação da atividade do receptor NIK e sua eficiência quando submetida à infecção por begomovírus. Além disso, procurou-se avaliar a cinética relacionada à atividade de cinase de NIK.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.A.** 2003. Activation Loop Phosphorylation and Catalysis in Protein Kinases: Is There Functional Evidence for the Autoinhibitor Model? *Biochemistry*. **42**, 601-607.
- Alzal, TA. Wood, AJ. Lightfoot, DA.** 2008. Plants receptor-like serine threonine kinases: Roles in signalling and plant defense. *The American Phytopathological Society*. **20**, 507-517.
- Becraft, PW.** 1998. Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Science* **3**, 384-88.
- Bleecker, AB. Kende, H.** 2000. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review Cell* **16**, 1-18.
- Braun, DM. Walker, JC.** 1996. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 70-73.
- Brough, CL. Sunter, G. Gardiner, WE. Bisaro, DM.** 1992. Kinetics of tomato golden mosaic virus DNA replication and coat protein promoter activity in *Nicotiana tabacum* protoplasts. *Virology*. **187**, 1-9.
- Dievart, A. Clark, SE.** 2004 LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* **131**, 251-261.
- Clark, SE. Williams, RW. Meyerowitz, EM.** 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- Carvalho, CM. Santos, AA. Pires, SR. Rocha, CS. Saraiva, DI.** 2008. Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus. *PLoS Pathogens* **4**, p.e1000247. doi:10.1371/journal.ppat.1000247.

- Endre, G. Kereszt, A. Kevei, Z. Mihacea, S. Kalo, P. Kiss, GB.** 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- Fontes, EPB. Eagle, PA. Sipe, PS. Luckow, VA. Hanley-Bowdoin, L.** 1994a. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 8459-8465.
- Fontes, EPB. Gladfelter, HJ. Schaffer, RL. Petty, ITD. Hanley-Bowdoin, L.** 1994b. Geminivirus replication origins have a modular organization. *The Plant Cell* **6**, 405-416.
- Fontes, EPB. Santos, AA. Luz, DF. Waclawovsky, AJ. Chory, J.** 2004. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes & Development* **18**, 2545–2556.
- Gomez-Gomez, L. Boller, T.** 2002. Flagellin perception: A paradigm for innate immunity. *Trends Plant Science* **7**, 251-256.
- Hecht, V.Vielle-Calzada, JP. Hartog, MV. Schmidt, EDL. Boutilier, K. Grossniklaus, U. De Vries, SC.** 2001. The arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence culture. *Plant Physiology* **127**, 803-816.
- Hubbard, SR. Till, JH.** 2000. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual Review of Biochemistry* **69**, 373–398.
- Jeske, H. Lutgemeier, M. Preiss, M.** 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal* **20**, 6158-6167.
- Jonhson, LN. Noble, NE. Owen, DJ.** 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.
- Kobe, B. Deisenhofer, J.** 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biology Science* **19**, 415-420.

- Lehti-Shiu, M. Zou, C. Hanada, K. Shiu, S.** 2009. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase-Pelle genes. *Plant Physiology* **150**, 12-26.
- Li, J. And Chory, J.** 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
- Lynch, M. Conery, JS.** 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**, 1151-1155.
- Mariano, AC. Andrade, MO. Santos, AA. Carolino, SMB. Oliveira, ML. Baracat-Pereira, M.C. Bromoshenkel, SH. Fontes EPB.** 2004. Identification of a novel receptor- like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **318**, 24-31.
- Massagué, J.** 1998. TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 753–791.
- Morillo, SA. Tax, FE.** 2006. Functional analysis of receptor-like kinase in monocots and dicots. *Current Opinion Plant Biology* **9**, 460-469.
- Moriones, E. and Navas-Castillo, J.** 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* **71**, 123–134.
- Nolen, B. Taylor, S. Ghosh, G.** 2004. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell* **15**, 661-675.
- Palmer, KE. Rybicki, EP.** 1998. The molecular biology of *Mastrevirus*. *Advancing Virus Research* **50**, p.183-234.
- Pawson, T. Nash, P.** 2000. Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes and Development* **14**, 1027-1047.
- Polston, JE. Bois, C. Serra, CA. Cocepcion, S.** 1994. First report of tomato yellow leaf curl – like geminivirus from tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* **78**, 831-834.

- Rojas, MR. Hagen, O. Lucas, WJ. Gilbertson, RL.** 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual review of phytopathology* **43**, 361-394.
- Santos, AA. Carvalho, C.M. Florentino, LH. Ramos, HJO. Fontes, EPB.** 2009. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *Plos ONE* **4**, p. E5781.
- Seifert, GJ. Blankopf, C.** 2010. Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiology* **153**, 467-478.
- Shiu, S. Bleecker, AB.** 2001a. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academic of Science USA* **98**, 10763-10768.
- Shiu, S. Bleecker, AB.** 2001b. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function and signaling. *Science*, **102**,1-12.
- Shiu, S. Bleecker, AB.** 2003. Expansion of the receptor-like kinase-pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **132**, 530-543.
- Shah, K. Vervoort, J. De Vries, SC.** 2001. Role of threonines in the arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 41263-41269.
- Shiu, SH. Karlowski, WM. Pan, R. Tzeng, YH. Mayer, KF. Li, WH.** 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The Plant Cell* **16**, 220-234.
- Song, WY. Wang, GL. Chen, LL. Kim, HS. Pi, LY. Holsten, T. Gardner, J. Wang, B. Zhai, WX. And Zhu, LH.** 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.
- Stanley, J. Bisaro, DM. Briddon, RW. Brow, JK. Fauquet, CM. Harrinson, BD. Rybick, EP.** 2005. *Geminiviridae*. P.301-326 in: virus taxonomy: classification

and nomenclature of viruses: eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses, eds. *Elsevier/academic press*, london.

Stracke, S. Kistner, C. Yoshida, S. Mulder, L. Sato, S. Kaneko, T. Tabata, S. Sandal, N. Stougaard, J. Szczyglowski, K. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.

Timmersmans, MCP. Das, OP. Messing, J. 1994. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal Replicons. *Plant Molecular Biology* **45**, 79-112.

Torii, KU. Mitsukawa, N. Oosumi, T. Matsuura, Y. Yokoyama, R. Whittier, RF. Komeda, Y. 1996. The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**, 735-746.

Vanitharani, R. Chellappan, P. Fauquet, CM. 2005. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Science* **10**, 144-151.

Walker, JC. 1994. Structure and function of the receptor-like protein kinase of higher plants. *Plant Molecular Biology* **26**, 1599-1609.

Zhang, S. Klessig, DF. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling trends plant. *Science* **6**, 520-527.

Zhang, XS. Choi, JH. Heinz, J. Chetty, CS. 2006. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of *arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase LRR RLK. *Genes. Journal of Molecular Evolution* **63**, 612-621.

Zhong, R. Richardson, EA. Ye, ZH. 2007. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2776–2792.

Zhou, A. Wang, H. Walker, JC. Li, J. 2004. BRI1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Journal* **40**, 399-409.

2 - ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A referida tese foi estruturada em uma Introdução Geral e três capítulos. O primeiro capítulo refere-se a uma revisão sobre o receptor imune NIK1 (NSP-Interacting kinase) intitulado: **NSP-Interacting Kinase, NIK: A Transducer of Plant Defense Signaling** publicada em Journal of Experimental Botany com a seguinte autoria: Anésia A. Santos, Kenia V. G. Lopes, Jorge A. C. Apfata e Elizabeth P. B. Fontes. O segundo capítulo descreve a modulação da atividade do receptor NIK1 e sua capacidade de conferir tolerância a begomovirus no sistema modelo Arabidopsis e foi intitulado: **Modulação da Atividade do Receptor NIK1 para Tolerância a Begomovirus**. Os experimentos desse capítulo integram um manuscrito submetido para publicação. O terceiro capítulo descreve a atividade de fosforilação de NIK1 e foi designado: **Atividade de Fosforilação de NIK1**.

3 - CAPÍTULO I

NSP-INTERACTING KINASE, NIK: A TRANSDUCER OF PLANT DEFENSE SIGNALING

Anésia A. Santos^{1,2}, Kênia V. G. Lopes¹, Jorge A. C. Apfata³, Elizabeth P. B. Fontes^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36571.000, Viçosa, MG, Brazil.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga, CNPq/FAPEMIG, Universidade Federal de Viçosa, 36571.000, Viçosa, MG, Brazil.

³Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571.000, Viçosa, MG, Brazil.

*Corresponding author: Elizabeth P. B. Fontes

DBB/BIOAGRO- Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n 36571.000 Viçosa- MG- Brazil. Phone: +553138992949, Fax: +553138992864, e-mail: bbfontes@ufv.br

Submitted on 18/05/2010

Number of figures: 2

Number of supplemental figures: 2

Running title: *NSP-interacting kinases*

ABSTRACT

The NSP-interacting kinase, NIK, belongs to the five leucine-rich repeats-containing receptor-like serine/threonine kinase subfamily that includes members involved in plant development and defense. NIK was first identified by its capacity to interact with the geminivirus nuclear shuttle protein (NSP) and has been strongly associated with plant defense against geminivirus. Recent studies corroborate its function in transducing a defense signal against virus infection and describe components of NIK-mediated antiviral signaling pathway. This mini-review describes the NIK role as a transducer of a novel layer of plant innate defense, presents new data on NIK function and discusses its possible involvement in plant development.

NIKs (NSP-interacting kinases): a functionally redundant branch of the LRR-RLK-II subfamily in counteracting virus infection

NIK receptors belong to the plant defense group of the leucine-rich repeat (LRR) receptor-like kinase (RLK) subfamily, designated LRR-RLK II (Shiu and Bleecker, 2001; Dievart and Clark, 2004). This subfamily of RLKs is constituted by 14 proteins harboring four complete LRRs (with 24 residues) and a fifth incomplete LRR (with 16 residues) arranged in a single continuous block within the extracellular domain (Zhang *et al.*, 2006). Based on sequence conservation and structural features, the members of the LRR-RLK II subfamily are clustered into three distinct branches: (i) antiviral defense proteins (ii) developmental and defense proteins, such as the somatic embryogenesis receptor-like kinases (SERK-like) including SERK1 (Hecht *et al.*, 2002; Santos and Aragão, 2009) and SERK3/BAK1 [Brassinosteroid-Insensitive1 (BRI1)-associated kinase 1; Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2001; Chinchilla *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007], and (iii) functionally unassigned proteins. The Arabidopsis NSP-interacting kinase 1, NIK1 (At5g16000), NIK2 (At3g25560) and NIK3 (At1g60800) are in the defense group I of the LRR-RLKII subfamily and are virulence targets of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein, NSP (Fontes *et al.*, 2004). NSP from CaLCuV (*Cabbage leaf curl virus*; Hill *et al.*, 1998) interacts with all three NIKs from Arabidopsis to suppress their kinase activity (Fontes *et al.*, 2004).

The NSP-NIK interaction is also conserved among geminivirus NSPs and NIK homologs from different hosts (Mariano *et al.*, 2004). Tomato and soybean NIK homologs also interact stably with NSP from CaLCuV (Fontes *et al.*, 2004) and with NSPs from the tomato-infecting geminiviruses TGMV (*Tomato golden mosaic virus*; Fontes *et al.*, 1994; Mariano *et al.*, 2004), TCrLYV (Tomato crinkle leaf yellows virus; Galvão *et al.*, 2003; Mariano *et al.* 2004) and ToYSV (*Tomato yellow spot virus*; Andrade *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2008). Several lines of evidence indicate that NIK functions in defense. NSP from CaLCuV acts as a virulence factor to suppress the kinase activity of transmembrane receptor NIKs (Fontes *et al.*, 2004). Second, loss of NIK1, NIK2 or NIK3 function in Arabidopsis is also linked to an enhanced susceptibility phenotype to CaLCuV infection (Fontes *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). In addition,

overexpression of NIK1 from *Arabidopsis* in tomato plants attenuates symptom development and delays ToYSV infection (Carvalho *et al.*, 2008).

Recent progress towards elucidating the NIK-mediated antiviral signaling includes the identification of the ribosomal protein L10 (rpL10) as the immediate downstream effector in the pathway (Carvalho *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2008). Phosphorylation of rpL10 by NIK promotes translocation of the ribosomal protein to the nucleus where it may function to mount a defense response that negatively impacts virus infection. The bipartite geminivirus NSP suppresses NIK activity through specific binding to the kinase domain and enhances geminivirus pathogenicity. Upon geminivirus infection, rpL10 is trapped within the cytoplasm to prevent the establishment of a host environment that disfavors virus proliferation and/or spread.

Components of the NIK-mediated signaling pathway

Recent research has provided new insights into the components and regulatory mechanisms of the NIK-mediated signaling pathway. The ribosomal protein L10 (rpL10) and L18 (rpL18) were both isolated through two-hybrid screening by their capacity to bind to the kinase domain of NIK1 (Rocha *et al.*, 2008). However, only rpL10 has been shown to be biochemically and genetically linked to the NIK signaling pathway. The ribosomal protein L10 is phosphorylated by NIK1, NIK2 and NIK3 *in vitro* and by NIK1 *in vivo*, whereas rpL18 is not a NIK substrate (Rocha *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2008). Phosphorylation of rpL10 by NIK1 redirects the ribosomal protein to the nucleus while rpL18 remains in the cytoplasm when co-expressed with NIK1 in tobacco leaves (Carvalho *et al.*, 2008). Furthermore, loss of rpL10 function, but not rpL18 function, increases susceptibility to geminivirus infection, recapitulating the *nik1* null allele phenotype (Rocha *et al.*, 2008).

Despite the observation that rpL18 does not serve as an immediate effector of NIK signaling, rpL18 binds to the kinase domain of NIK1 with high affinity. Different rounds of two-hybrid screenings of distinct *Arabidopsis* cDNA libraries

for NIK1 interacting partners resulted in the independent isolation of rpL18 genes with high frequency [four rpL18 cDNA clones from screening 1×10^5 clones from leaf cDNA library (Rocha *et al.*, 2008) and seven rpL18 cDNA clones from screening 6×10^5 clones from seedling cDNA library (unpublished)]. Binding of rpL18 to NIK does not affect its kinase activity, but competes efficiently with rpL10 binding. These results raise the questions as to whether rpL18 functions as a negative regulator of the NIK-mediated signaling pathway or whether NIK prevents rpL18 from functioning as a positive contributor in viral infection. The latter hypothesis cannot be ruled out simply by the observation that inactivation of the *rpL18aB* gene (T-DNA insertion in At2g34480) does not alter geminivirus infection (Rocha *et al.*, 2008) because the Arabidopsis genome encodes three rpL18 homologs (*rpL18aA*, *rpL18aB* and *rpL18aC*) which might function redundantly in virus infection (Barakat *et al.*, 2001).

NIK as a kinase receptor

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). NIK exhibits trans-autophosphorylation activity *in vitro* and substrate phosphorylation activity *in vitro* and *in vivo* (Fontes *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2008). Mutations in the activation loop of NIK that block autophosphorylation activity also impair the capacity of NIK to elicit a defense response against geminivirus (Santos *et al.*, 2009), establishing that it is an authentic defense signal transducer. Likewise, a perfect correlation has been found between the kinase activity of NIK and the efficiency of NIK-driven nuclear relocation of rpL10. A constitutively active mutant of NIK is more effective at redirecting rpL10 to the nucleus, and inactive mutants of NIK fail to change the cytosolic localization of rpL10. In summary, mutations in the A-loop affect similarly the NIK capacity to elicit an antiviral response and to mediate a phosphorylation-dependent nuclear relocation of the rpL10 downstream component. This positive correlation is consistent with the notion that the regulated nucleocytoplasmic shuttling of rpL10 links the antiviral response to receptor activation.

Possible mechanisms of NIK activation

As a single-pass transmembrane receptor kinase, NIK is expected to dimerize or multimerize with itself and/or coreceptors to promote transphosphorylation and subsequent activation of the kinase. In mammalian and plant cells, the oligomerization of single-pass transmembrane receptor kinases has been proposed to be either induced or stabilized by ligands as the critical early event that triggers signaling and transduction from the receptor (Schlessinger 2000; Hubbard and Miller, 2007; Vert *et al.*, 2005; Kim and Wang, 2010). However, there is a complete lack of information with respect to the nature and identity of possible ligands, stimuli or mechanisms that trigger or stabilize NIK dimerization or multimerization with a coreceptor. Because NIK functions in geminivirus infection (Carvalho *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2008), the virus itself could be interpreted as a stimulus that activates the NIK signaling pathway, although the molecular basis for viral infection-induced receptor activation is currently unknown.

BAK1/SERK3, the best characterized member of the LRR-II subfamily of receptor-like kinases, functions as a coreceptor of BRI1 in Brassinosteroid signaling and of FLS2 in plant innate immunity response (for review see Chinchilla *et al.*, 2009). This scenario of BAK1 functioning as coreceptor of LRR-RLK receptors resembles the activation mechanism of epidermal growth factor (EGF) receptors (Schlessinger, 2002). EGF receptor type I, ERBB1, exists as pre-formed dimers but depends on ligand-induced heterooligomerization with ERBB2 for full activation of the EGF signaling response. SERK1 also dimerizes with BRI1 *in vitro* and *in vivo* and SERK4, also designated BAK7, forms a complex with BAK1 or BRI1 in transducing developmental signals (Karlova *et al.*, 2006, He *et al.*, 2007; Albrecht *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2010). From these recent studies with SERK-like coreceptors, a common theme is that the five LRRs-containing receptor-like kinases function as coreceptors for ligand-binding LRR-RLKs in a stimulus-dependent fashion. As members of the LRR-RLK II subfamily, NIKs are likely to target a LRR-RLK-mediated signaling pathway as well, although a LRR-RLK partner of NIKs has yet to be identified.

Activation of many kinases requires phosphorylation of the activation segment that is defined by the region delimited by two conserved tripeptide motifs, DFG and APE (Nolen *et al.*, 2004). This region is highly conserved among members of the LRR-RLK II subfamily and other members of the extended LRR-RLK family, such as BRI1, which belongs to the LRR-RLK23 subfamily. For some of these receptors, such as NIK1, BAK1 and BRI1, the phosphorylation status of the activation segment has been shown to dictate their kinase activity (Carvalho *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2009). NIK1 is phosphorylated *in vitro* at the conserved positions Thr-474 and Thr-469 (Santos *et al.*, 2009). NIK1 Thr-474 aligns at the same position as SERK1 Thr-468 and SERK3/BAK1 Thr-455, which may be functionally analogous phosphorylation sites. SERK1 Thr-468 is absolutely essential for *in vitro* kinase activity (Shah *et al.*, 2001), and BAK1 Thr-455 plays a critical role in BAK1 signaling (Wang *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2009). In addition to being phosphorylated *in vitro*, replacement of Thr-474 with alanine impairs the capacity of NIK1 to elicit a defense response and to redirect rpL10 to the nucleus *in vivo* (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). In contrast, replacement of Thr-474 with a phosphomimetic aspartate residue increases autophosphorylation activity and NIK-mediated relocalization of rpL10 to the nucleus. Taken together these results support the notion that phosphorylation at the essential Thr-474 residue within the A-loop constitutes a key regulatory mechanism for NIK activation. Thus, the NIK1 residue Thr-474 is functionally equivalent to the corresponding BAK1 Thr-455 and BRI1 (Brassinosteroid insensitive receptor 1) Thr-1049, which align at the same position in their respective A-loop and have been shown to be required for kinase function and signaling *in planta* [Wang *et al.*, 2005; 2008; Santos *et al.*, 2009].

Further support to the notion that autophosphorylation at Thr-474 is a key event that promotes kinase activation arose from studies of the inhibitory effect of geminivirus NSP on NIK mutant proteins (Santos *et al.*, 2009). The NSP binding site corresponds to an 80 amino acid stretch (positions 422–502) of NIK that encompasses the putative active site for Ser/Thr kinases (subdomain VIb–HrDvKssNxLLD) and the activation loop (subdomain VII–DFGak/rx, plus subdomain VIII–GtxGyiaPEY; Fontes *et al.*, 2004). Binding of NSP to NIK

inhibits 50% of its kinase activity and promotes a further 50% inhibition of the residual activity of activation loop alanine substitution mutants but not the phosphomimetic T474D mutant (Santos *et al.*, 2009). In this case, replacement of the essential Thr-474 residue with the aspartate residue does not impair NSP binding but bypasses its inhibitory effect on kinase activity. These results suggest that the NSP inhibitor acts upstream to the phosphorylation at position 474.

While phosphorylation at Thr-474 is linked to an activation loop-dependent mechanism for NIK function, phosphorylation of Thr-469 appears to have an auto-inhibitory role (Santos *et al.*, 2009). Replacing Thr-469 with alanine relieves repression and enhances substrate phosphorylation. Furthermore, mutation at Thr-469 does not inhibit autophosphorylation activity or impair the capacity of the mutant protein to elicit a defense response and to redirect rpL10 to the nucleus. This phosphorylation scheme for kinase regulation opens an unprecedented view for negative regulation of kinase activity through phosphorylation of conserved sites within the A-loop of plant RLKs. Although phosphorylation of threonine residues within the A-loop has been demonstrated for SERK1 *in vitro* and for BRI1 and BAK1 *in vivo*, the functionally relevant phosphorylated residues on these LRR-RLKs positively regulate kinase activity (Shah *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; 2008). In the case of NIK, it has been proposed that autophosphorylation of Thr-469 within the NIK1 A-loop negatively controls rpL10 phosphorylation and hence allows the kinase to control the extent of the response in a sustained signaling pathway more efficiently. Whether this inhibitory mechanism is specific for the rpL10 substrate, providing NIK1 with the capacity to differentially phosphorylate pathway components, remains to be determined. In the case of BAK1, the activation-loop residue Thr-450, which is equivalent to NIK1 Thr-469 (Fig. 1), plays independent and separate roles in BR signaling and flagellin signaling (Wang *et al.*, 2008).

NIK mediated antiviral signaling pathway

Based on current data and common features of LRR-RLKII family, we propose a mechanistic model for a NIK-mediated defense signaling pathway and

its interaction with the geminivirus NSP (Fig. 2). In this model, upon unidentified stimuli, the LRR extracellular domain undergoes oligomerization, allowing the intracellular kinase domains to transphosphorylate and to activate one another. Alternatively or additionally, NIK may serve as a coreceptor for a defense-signaling cascade and interacts with an unidentified ligand-dependent LRR-RLK receptor in response to virus infection. In this scenario, the active kinase then recruits and phosphorylates the downstream component rpL10 to propagate the defense-signaling cascade that impairs virus replication and/or movement. Regulation of kinase activity may be dictated by two components: a conserved Ser/Thr kinase activation component that results from autophosphorylation of Thr-474 and an inhibitory component at a distinct residue (Thr-469) within the A-loop that down regulates substrate phosphorylation. Phosphorylation at Thr-474 activates the kinase and may precede phosphorylation at Thr-469, providing a mechanism for NIK to control the extent of substrate phosphorylation in a sustained signaling response. This stepwise pattern of phosphorylation within the activation-loop domain (A loop) of NIK1 is supported by the failure of MS/MS analyses to detect phosphorylated Thr-469 in the *in vitro* phosphorylated T474A mutant but not to detect phosphorylation at Thr-474 in the *in vitro* phosphorylated T469A mutant (Santos et al., 2009, data not shown).

NSP counters activation of the pathway by binding to the NIK kinase domain and sterically interfering with phosphorylation of Thr-474 in the A-loop. As consequence, phosphorylation of the substrate rpL10 is impaired and the ribosomal protein is trapped in the cytoplasm during geminivirus infection (see confocal microscopy of fluorescent rpL10 in infected cells, as an insert in Fig. 2; Carvalho *et al.*, 2008). NSP inhibition of NIK1 prevents activation of the NIK-mediated signaling pathway resulting in an intracellular environment that is more favorable to virus proliferation and spread.

In addition to questions about the mechanistic model of NIK-mediated defense response indicated in Fig. 2, it is not known how phosphorylated rpL10A delays the onset of virus infection. Yeast rpL10A is required for joining of the 40S and 60S subunits (Eisinger *et al.*, 1997) and for large subunit nuclear export through direct interaction with Nmd3p, a NES (nuclear export signal)-containing

protein that is specifically associated with 60S subunits (Gadal *et al.*, 2001). By analogy with the yeast rpL10A homolog, perturbation of Arabidopsis rpL10A nucleocytoplasmic trafficking by NIK1 would interfere with ribosome subunit assembly and 60S subunit export from the nucleus, which would affect general translation and impair virus infection. Alternatively, putative rpL10 extraribosomal functions associated with regulation of transcriptional factors (Montecarlo *et al.*, 1993; Imafuku *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2002), translational control of gene expression (Karl *et al.*, 1999) and suppression of cell proliferation (Chávez-Rios *et al.*, 2003) could serve as potential host defense strategies against virus. The identification of downstream targets of rpL10A is crucial to decipher this layer of innate defense.

Are NIK-like and SERK-like receptors functionally redundant?

NIKs and SERKs belong to the same subfamily and it is likely that they functionally overlap to modulate development and defense signaling pathways. In fact, partial redundancy has been demonstrated for the more related SERK-like members (Chinchilla *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2010). Several members of the SERK-like group, such as SERK1, BAK1/SERK3 and BAK7/SERK4, interact with BRI1 *in vivo* (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002; Karlova *et al.* 2006, Jeong *et al.*, 2010) and partially substitute for one another in BR signaling (Karlova *et al.*, 2006, Jeong *et al.*, 2010). BAK1 and BAK7 also show functional redundancy in cell death events (Jeong *et al.*, 2010). Although *in vivo* interaction between NIKs and BRI1 or SERK3/BAK1 has not been addressed, manipulation of NIK transcript levels results in developmental phenotypes that antagonize BRI1-associated phenotypes. The developmental phenotype of *nik* knockout lines resembles that of BRI1 overexpressing lines and vice versus (Fig. S1). The *nik* knockouts, *nik1*, *nik2* and *nik3*, display longer and narrower leaves and more elongated petioles than wild type leaves grown under short day conditions (Fig. S1A), resembling plants that overexpress BRI1- or its coreceptor BAK1 (Jeong *et al.*, 2010). Overexpression of NIK1 in tomato plants causes a reduction in root growth (Fig. S1B) in contrast to BRI1 overexpressing lines that display increased root growth. These results show that an inverse correlation between BRI1 and

NIK levels causes similar developmental phenotypes and, as such, NIK transcripts may impact negatively some aspect of BRI1-related growth, as opposing to the BAK function in BR signaling.

With respect to their defense roles, it has been established that BAK1 and SERK1 cannot functionally replace NIK1 in transducing an antiviral signaling response. Loss of BAK1 and SERK1 function does not enhance susceptibility to geminivirus infection and SERK1 does not complement the enhanced susceptibility phenotype of *nik1* knockouts to geminivirus infection (Fontes *et al.*, 2004; Fig. S2A). In addition, rpL10, the downstream effector of NIK-mediated antiviral signaling, is not phosphorylated by BAK1 or SERK1 (Fig. S2B) and is not redirected to the nucleus by these receptors (Carvalho *et al.*, 2008). Whether the receptors would function redundantly in pattern-recognition receptor (PRR)-dependent signaling, which has been shown to be mediated by BAK1, remains to be determined.

Conclusion

Since the discovery of NSP-interacting kinases, several features of the NIK-mediated antiviral signaling have been elucidated (Fig. 2). We now know that the transmembrane receptor NIK1, an authentic serine/threonine kinase transducer, must be activated to trigger a defense response against virus. Regulation of NIK kinase activity depends on a conformational change of the A-loop induced by phosphorylation of Thr-474. Activated NIK regulates nucleocytoplasmic trafficking of rpL10, linking the antiviral response to receptor activation. However, major players in the defense pathway are still missing and important questions remain unanswered. What is the stimulus or molecular signal that triggers NIK activation? Does NIK serve as coreceptor for LRR-RLKs? What are the molecular events downstream of rpL10 that defend against virus infection? If the phosphomimetic T474D mutant supports a sustained NIK signaling, comparison of T474D-induced global variation in gene expression with the virus-induced transcriptome may provide insight into the signals that trigger signaling. Alternatively, characterization of ligand-binding receptors that interact

with NIK may lead to the identification of the trigger. Finally, the identification of downstream targets of rpL10A will be crucial to unravel this layer of innate defense.

Our current knowledge of the transmembrane NIK receptors and their possible functional overlap with other members of the LRR-RLKII sub-family is still rudimentary. Here we showed that SERK-like receptors cannot replace NIK1 in antiviral signaling response. However, the observation that some developmental phenotypes of *nik* null alleles and NIK overproducers are opposite to BRI1-associated phenotypes suggests that NIK1 may be involved in the BRI1 dependent developmental pathway. The molecular basis for such crosstalk is yet to be demonstrated.

Supplementary data

Supplementary data are available at JXB online.

Supplementary Fig. S1. Developmental phenotypes associated with manipulation of NIK transcript levels

Supplementary Fig. S2. SERK-like receptors cannot substitute for NIK in antiviral signaling.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Linda Hanley-Bowdoin at North Carolina State University, US, for critically reading the manuscript. This research was supported by the Brazilian Government Agencies CNPq grants 559602/2009-0, [573600/2008-2](#), and 470878/2006-1 (to E.P.B.F.), FAPEMIG grant EDT 523/07, CBB-APQ-00070-09 and FINEP grant 01.09.0625.00 (to E.P.B.F.) A.A.S. is a PNPD/CAPES postdoctoral fellow. K.V.G.L. is supported by a CNPq graduate fellowship (grant 560571/2008-9).

References

- Albrecht, C. Russivano, E. Kemmering, B. Kwaaitaal, M. and de Vries, S.** 2008. Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. *Plant Physiology* **148**, 611-619.
- Andrade, EC. Manhani, GG. Alfenas, PF. Calegario, RF. Fontes, EPB. Zerbini, FM.** 2006. Tomato yellow spot virus, a tomato-infecting begomovirus from Brazil with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology* **87**, 3687-3696.
- Barakat, A. Szick-Miranda, K. Chang, I-F. Guyot, R. Blanc, G. Cooke, R. Delseny, M. Bailey-Serres, J.** 2001. The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the Arabidopsis Genome. *Plant Physiology* **127**, 398–415.
- Carvalho, CM. Santos, AA. Pires, SR. Rocha, SR. Saraiva, DI. Machado, JPB. Mattos, EC. Fietto, LG. Fontes, EPB.** 2008. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against viruses. *PLoS Pathogen* **4**, e1000247.
- Chávez-Rios, R. Arias-Romero, LE. Almaraz-Barrera, Mde J. Hernández-Rivas, R. Guillén, N. Vargas, M.** 2003. L10 ribosomal protein from *Entamoeba histolytica* share structural and functional homologies with QM/Jif-1: proteins with extraribosomal functions. *Molecular and Biochemical Parasitology* **127**, 151–160.
- Chinchilla, D. Shan, L. He, P. de Vries, S. Kemmerling, B.** 2009. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science* **14**, 535-541.
- Chinchilla, D. Zipfel, C. Robatzek, S. Kemmerling, B. Nürnberger, T. Jones, JDG. Felix, G. Boller, T.** 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defense. *Nature* **448**, 497-500.

- Dievart, A. Clark, SE.** 2004. LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* **131**, 251-261.
- Eisinger, DP. Dick, FA. Trumpower, BL.** 1997. Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5136-5145.
- Fontes, EPB. Gladfelter, HJ. Schaffer, RL. Petty, ITD. Hanley-Bowdoin, L.** 1994. Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* **6**, 405–416.
- Fontes, EPB. Santos, AA. Luz, DF. Waclawovsky, AJ. Chory, J.** 2004. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes & Development* **18**, 2545-2556.
- Gadal, O. Strau, D. Kessl, J. Trumpower, B. Tollervey, D. Hurt, E.** 2001. Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein RpL10Ap. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3405-3415.
- Galvão, RM. Mariano, AC. Luz, DF. Alfenas, PF. Andrade, EC. Zerbini, FM. Almeida, MR. Fontes, EPB.** 2003. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology* **84**, 715–726.
- Hanks, SK. Quinn, AM. Hunter, T.** 1988. The protein kinase family-Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42–52.
- He, K. Gou, X. Yuan, T. Lin, H. Asami, T. Yoshida, S. Russle, SD. Li, J.** 2007. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell death pathways. *Current Biology* **17**, 1109-1115.
- Hecht, V. Vielle-Calzada, J. Hartog, MV. Schmidt, EDL. Boutilier, K. Grossniklasu, U. de Vries, S.** 2001. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing

ovule and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* **127**, 803-816.

Heese, A. Hann, DR. Glimenez-Ibanez, S. Jones, AME. He, K. Li, J. Schroeder, JI. Peck, SC. Rathjen, JP. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 12217-12222.

Hill, JE. Strandberg, JO. Hiebert, E. Lazarowitz, SG. 1998. Asymmetric infectivity of pseudorecombinants of cabbage leaf curl virus and squash leaf curl virus: Implications for bipartite geminivirus evolution and movement. *Virology* **250**, 283–292.

Hubbard, SR. Miller, WT. 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 117-123.

Imafuku, I. Masaki, T. Waragai, M. Takeuchi, S. Kawabata, M. Hirai, S. Ohno, S. Nee, LE. Lippa, CF. Kanazawa, I. Imagawa, M. Okazawa, H. 1999. Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. *The Journal of Cell Biology* **4**, 121-134.

Jeong, JY. Shang, Y. Kim, BH. Kim, SY. Song, JH. Lee, JS. Lee, MM. Li, J. Nam, KH. 2010. BAK7 Displays Unequal Genetic Redundancy with BAK1 in Brassinosteroid Signaling and Early Senescence in Arabidopsis. *Molecule and Cells* **29**, 259-266.

Karl, T. Onder, K. Kodzius, R. Pichová, A. Wimmer, H. Hundsberger, H. Löffler, M. Klade, T. Beyer, A. Breitenbach, M. Koller, L. 1999. GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically. *Current Genetics* **34**, 419-429.

Karlova, R. Boeren, S. Russinova, E. Aker, J. Vervoort, J. and de Vries, S. 2006. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESISRECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* **18**, 626-638.

- Kim, T-W. Wang, Z-Y.** 2010. Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 14-43.
- Li, J. Wen, J. Lease, KA. Dorke, JT. Tax, FE. Walker, JC.** 2002. BAK1, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modules brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 213-222.
- Mariano, AC. Andrade, MO. Santos, AA. Carolino, SMB. Oliveira, ML. Baracat-Pereira, MC. Brommonshenkel, SH. Fontes, EPB.** 2004. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **318**, 24-31.
- Monteclaro, FS. Vogt, PK.** 1993. A jun-binding protein related to a putative tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**, 6726–6730.
- Nam, KH. Li, J.** 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203–212.
- Nolen, B. Taylor, S. Ghosh, G.** 2004. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell* **15**, 661–675.
- Oh, HS. Kwon, H. Sun, SK. Yang, C-H.** 2002. QM, a Putative Tumor Suppressor, Regulates Proto-oncogene c-Yes. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 36489–36498.
- Rocha, CS. Santos, AA. Machado, JPB. Fontes, EPB.** 2008. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology* **380**, 165-169.
- Santos AA, Carvalho CM, Florentino LH, Ramos JJO, Fontes EPB.** 2009. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE* **4**, e5781.
- Santos, MO. Aragão, FJ.** 2009. Role of SERK genes in plant environmental response. *Plant Signaling and Behavior*. **4**, 12.

- Schlessinger, J.** 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schlessinger, J.** 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669-672.
- Shah, K. Vervoort, J. de Vries, SC.** 2001. Role of threonines in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 41263-41269.
- Shiu, SH. Bleecker, AB.** 2001. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 10763–10768.
- Vert, G. Nemhauser, JL. Galdner, N. Hong, F. Chory, J.** 2005. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 177-201.
- Yun, HS. Bae, YH. Lee, YJ. Chang, SC. Kim, SK. Li, J. Nam, KH.** 2009. Analysis of phosphorylation of the BAK1/BRI1 complex in Arabidopsis reveals amino acid residues critical for receptor formation and activation of BR signaling. *Molecules and Cells* **27**, 183-190.
- Wang, X. Goshe, MB. Soderblom, EJ. Phinney, BS. Kuchar, JA. Li, J. Asami, T. Yoshida, S. Huber, SC. Clouse, SD.** 2005. Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* **17**, 1685-1703.
- Wang, X. Kota, U. He, K. Blackburn, K. Li, J. Goshe, MB. Huber, SC. Clouse, SD.** 2008. Sequential Transphosphorylation of the BRI1/BAK1 Receptor Kinase Complex Impacts Early Events in Brassinosteroid Signaling. *Developmental Cell* **15**, 220-235.
- Zhang, XS. Choi, JH. Heinz, J. Chetty, CS.** 2006. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR RLK) genes. *Journal of Molecular Evolution* **63**, 612-21.

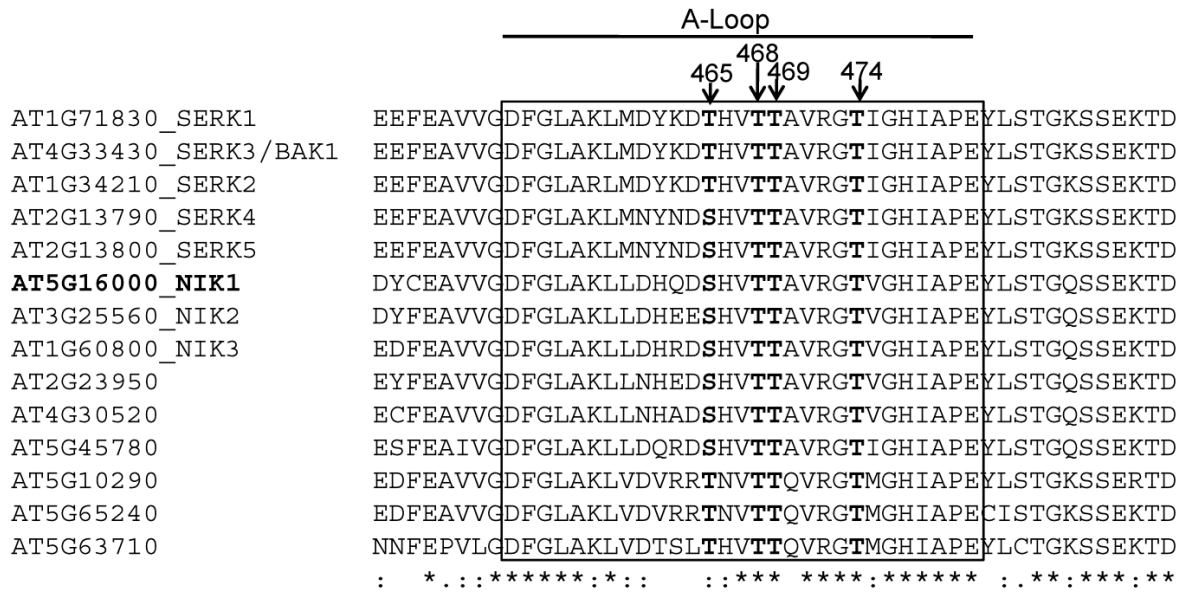


Fig. 1. Sequence alignment of the activation segment (boxed) among NIKs and other members of the LRR-RLKII subfamily. The activation segment of NIK1 was compared to the indicated members of the Arabidopsis LRR-RLK II subfamily. Conserved residues as potential phosphorylation sites are shown in bold and the numbering scheme refers to the NIK primary structure.

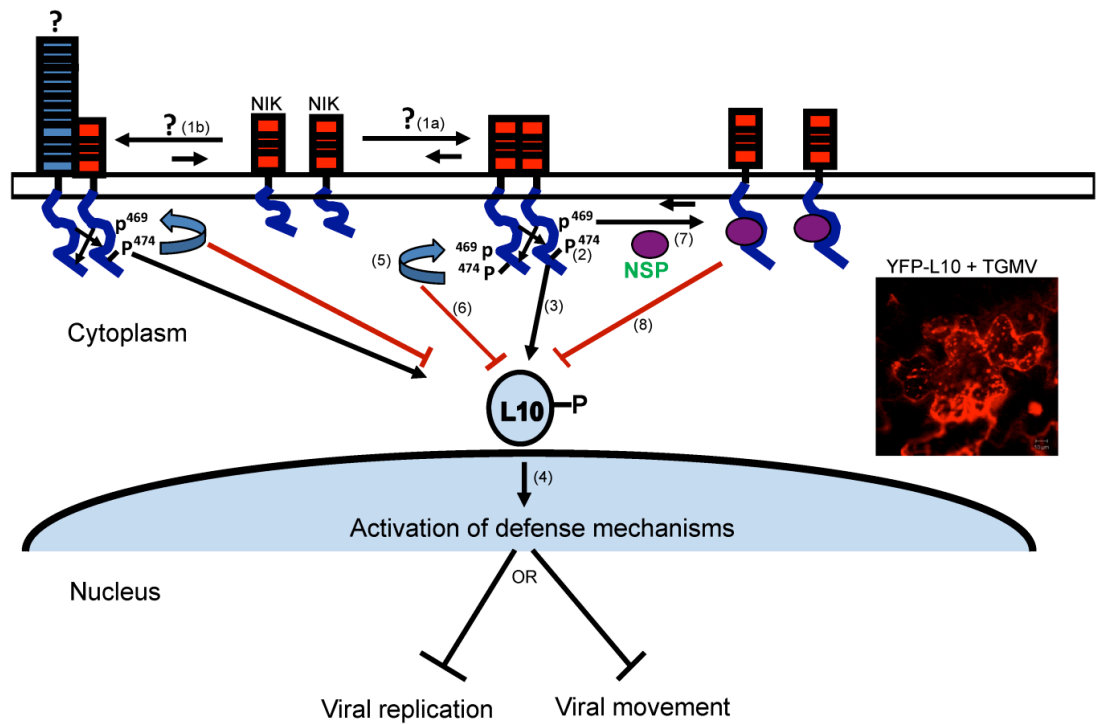


Fig. 2. Mechanistic model for NIK-mediated defense signaling pathway.

Stress-induced oligomerization of the extracellular domain of NIK (1a) brings the intracellular kinase domains into proximity and allows them to transphosphorylate Thr-474 and activate one another (2). Alternatively, NIK interacts with an unknown ligand-binding LRR-RLK in a stimulus-dependent manner (1b). Upon activation, NIK phosphorylates rpL10 (3) promoting its translocation to the nucleus (4), where it may mount a defense strategy that prevents virus proliferation and/or movement. Autophosphorylation of Thr-474 also leads to phosphorylation of Thr-469 (5), which then inhibits substrate phosphorylation (6). This two component phosphorylation scheme provides a mechanism by which NIK can control the extent of substrate phosphorylation during sustained NIK-mediated signaling. Conversely, binding of NSP to the NIK kinase domain (A-Loop) inhibits autophosphorylation at Thr-474 (7) and prevents receptor kinase activation and rpL10 phosphorylation (8), trapping rpL10 in the cytoplasm of infected cells (see the punctuate bodies in the insert).

4 - CAPÍTULO II

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE NIK1 PARA TOLERÂNCIA A BEGOMOVÍRUS EM ARABIDOPSIS

RESUMO

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Modulação da atividade de NIK1 para tolerância a begomovírus em Arabidopsis.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Luciano Gomes Fietto e Sebastião Tavares Rezende.

Vírus da família *Geminiviridae* são considerados um dos patógenos mais importantes por causarem sérios prejuízos agrícolas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Nessa família, o gênero *begomovirus* causa grandes perdas agrícolas, particularmente na produção de tomates nas Américas. Vários novos begomovírus têm sido reportados e eventos de recombinação gênica associados à grande diversidade de begomovírus têm aumentado a complexidade do seu controle. Além das medidas de controle clássicas, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas resistentes ou tolerantes à infecção por begomovírus tem se tornado um grande desafio. Aqui reportamos uma nova estratégia para controlar a infecção por begomovírus em plantas transgênicas através da modulação da atividade do receptor relacionado ao sistema imune de plantas designado NIK (NSP-Interacting Kinase). O receptor NIK possui atividade de cinase e é um alvo de virulência da proteína NSP de geminivírus durante o processo de estabelecimento da infecção. A treonina 474, presente no domínio cinase, quando mutada por ácido aspártico (um fosfomimético) promove a ativação constitutiva dos mecanismos de defesa mediados por NIK. A expressão ectópica de NIK-T474D em *Arabidopsis* promoveu uma diminuição global na síntese de proteínas, mas induziu a up-regulação de genes relacionados à defesa e a resistência adquirida sistêmica. A ativação constitutiva da via de sinalização mediada por NIK foi associada à tolerância da linhagem transgênica à infecção por CaLCuV. Coletivamente esses dados sugerem que a expressão ectópica de NIK-T474D constitui uma nova estratégia para controlar a infecção por begomovírus. A existência de homólogos de NIK em várias espécies de plantas economicamente importantes e o fato da interação NIK-NSP ser conservada em

diferentes espécies de begomovírus abrem margem para a possibilidade de se desenvolver outras espécies de plantas transgênicas tolerantes a begomovírus.

ABSTRACT

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012.
Activity modulation of NIK1 by begomovirus tolerance in Arabidopsis.
Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Sebastião Tavares Rezende.

Geminiviridae family viruses are considered the most important pathogen to be responsible to cause serious agricultural economic losses in tropical and subtropical region around the world. In this family, viruses of begomovirus genus cause huge agricultural losses particularly tomato culture in America. Many new begomovirus have being reported and genic recombination events associated to the big diversity of begomovirus had been increased the complexity of your control. Besides the classical control methods, the development of genetically modified plant resistents or tolerants to begomovirus infection has been a huge challenge. In this subject we reported a new strategy to control the begomovirus infection in transgenic plants by activity modulation of NIK (NSP-Interacting Kinase) receptor related to the system immune of plants. The NIK receptor has kinase activity and is a virulence target of NSP protein of geminivirus during the established process of infection. The threonine 474, present in the kinase domain, when mutated by aspartic acid (a phosphomimetic amino acid) promotes the constitutive activation of protection mechanisms mediated by NIK. The ectopic expression NIK-T474D in Arabidopsis promotes the global decrease in the synthesis of protein, but induced an up-regulation of related genes to defense and the systemic acquired resistance (SAR). The constitutive activation of the signaling pathway mediated by NIK was associated to the tolerance of Arabidopsis transgenic line to the infection by CaLCuV. Collectively, these results suggest that the ectopic expression of NIK-T474D constitutes a new strategy to control the infection by begomovirus. The existence of NIK's homologues in many plants species economically important and the fact of NIK-NSP interaction be conserved among different species of begomovirus open

margin to the possibility of development of other transgenic species begomovirus tolerant.

I - INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é composta por vírus de DNA que causam doenças em várias culturas agrícolas importantes abrangendo desde cereais a leguminosas. Devido à severidade das infecções causadas pelos geminivírus, sérios prejuízos econômicos têm sido contabilizados em regiões tropicais e subtropicais no mundo (Moffat, 1999; Shepherd *et al.*, 2009, Ilyas *et al.*, 2010), o que eleva essa família de vírus ao status de principal ameaça à agricultura mundial (Boulton, 2003; Mansoor *et al.*, 2003, Aragão & Faria, 2009).

O genoma dos geminivírus consiste de uma ou duas moléculas circulares de DNA fita simples (2.6 - 3.0 kb) que é replicado no núcleo das células vegetais diferenciadas. Durante a replicação, ocorre a formação de um intermediário fita-dupla circular que também serve como molde para a transcrição bidirecional do genoma viral (Gutierrez, 2000; Rojas *et al.*, 2005).

Os geminivírus compreendem a segunda família mais numerosa entre os vírus de plantas, superada apenas pela família *Potyviridae* (Berger *et al.*, 2005). A família *Geminiviridae* é composta por quatro gêneros: *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus* distinguidos de acordo com a estrutura do genoma (monopartido ou bipartido), inseto vetor (mosca-branca ou cigarrinha), planta hospedeira (monocotiledônea ou dicotiledônea) e origem filogenética (Mayo *et al.*, 1998; Stanley *et al.*, 2005).

O gênero *Begomovirus* constitui o maior grupo dentro da família *Geminiviridae*, sendo também o mais bem descrito pela literatura. É considerado um dos gêneros de maior importância econômica por causar doenças em culturas diversas como algodão, feijão, mandioca, pimenta, milho, maracujá e tomate (Brown, 1992; Polston *et al.*, 1994; Moriones & Navas-Castillo, 2000; Silva *et al.*, 2006). Nas Américas, o tomateiro é uma das espécies de plantas mais afetadas por begomovirose com epidemias que podem levar a 100% de perdas gerando sérias consequências econômicas. (Morales & Anderson, 2001).

Práticas de controle da disseminação dos geminivírus têm focalizado principalmente o combate ao inseto-vetor através da aplicação de inseticidas de alta toxicidade. No entanto, essa prática é alvo de sérias críticas já que causa seleção de populações resistentes do inseto-vetor, baixa relação custo-benefício e preocupações em relação à poluição ambiental associada (Aragão & Faria, 2009).

Uma alternativa que vem sendo explorada utiliza a biotecnologia para se obter culturas resistentes ou mais tolerantes a infecção por geminivírus. Pesquisadores do mundo todo têm se empenhado para obter plantas resistentes através da engenharia genética (Shepherd *et al.*, 2009). Porém, para se obter uma planta geneticamente modificada resistente a geminivírus é necessário, primeiramente, conhecer as vias de sinalização pelas quais estes vírus interagem com o hospedeiro. Dessa forma, pode-se identificar componentes moleculares e interações-chaves de uma via cuja manipulação pode comprometer o estabelecimento da infecção viral (Vanderschuren *et al.*, 2007).

A resistência de plantas à geminivírus vem sendo explorada através da transformação da planta-alvo com sequências de DNA proveniente do vírus (resistência derivada do patógeno) (Powell-Abel *et al.* 1986, Gonsalves, 1998; Hanson *et al.*, 1999, Shepherd *et al.*, 2007). No caso do begomovírus, a obtenção de linhagens de plantas expressando resistência derivada do patógeno não tem alcançado sucesso (Covey & Al-Kaff, 2000; Hou *et al.*, 2000). Somente uma exceção descrita pela literatura obteve êxito; trata-se de uma linhagem transgênica de feijão comum expressando um siRNA cujo alvo é a proteína Rep de BGMV (*Bean Golden Mosaic Virus*) que mostrou ser imune à infecção por BGMV (Aragão & Faria, 2009).

Em tomateiros, no entanto, uma estratégia realmente eficiente de silenciamento por RNA de interferência contra begomovírus ainda não foi alcançada. Essa dificuldade pode ser explicada pelo constante surgimento de novas espécies desses vírus que evoluem rapidamente através de recombinações e pseudo-recombinações gênicas. A emergência de novas espécies de begomovírus é uma resposta da evolução frente à forte pressão imposta pela seleção natural potencializada pela introdução de plantas transgênicas no ambiente. Essas recombinações geram diferenças nas sequências genômicas desses vírus que não

são reconhecidas pela maquinaria molecular de silenciamento expressa pela planta transformada (Ribeiro *et al.*, 2003; Castillo-Urquiza *et al.*, 2008). Assim, estratégias moleculares realmente efetivas na obtenção de linhagens transgênicas com um amplo espectro de resistência ou tolerância à begomovírus ainda não foram desenvolvidas.

Os begomovírus possuem genoma composto por um ou dois componentes, sendo que a maioria deles possui dois componentes genômicos denominados DNA A e DNA B. O DNA A contém os genes cujos produtos protéicos estão envolvidos com mecanismos de replicação, ativação da transcrição, encapsidação da progênie viral e supressão de funções de defesa por RNA de interferência (Timmermans *et al.*, 1994; Vanitharani *et al.*, 2005). O DNA B contém os genes requeridos para o movimento viral célula-a-célula e a longa distância (Timmermans *et al.*, 1994).

O DNA B dos geminivírus codifica os genes *NSP* e *MP* que atuam em conjunto para promover a difusão do vírus pela planta hospedeira estabelecendo uma infecção sistêmica. A proteína NSP (Nuclear Shuttle Protein) possibilita a movimentação do DNA viral entre o núcleo e o citoplasma da célula vegetal. A proteína MP (Movement Protein) é responsável pelo transporte do complexo viral NSP-DNA célula a célula através dos plasmodesmos e também a longa distância, via floema (Rojas *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Jeske, 2001).

De acordo com a importante função desempenhada por NSP no transporte intracelular do DNA viral nas células vegetais, acredita-se que NSP interaja com proteínas do hospedeiro nos diversos compartimentos celulares. A proteína NIK (NSP-Interacting Kinase) é um receptor transmembrana serina/treonina cinase que foi anteriormente isolado em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e soja (*Glycine max*) pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de begomovírus (Mariano *et al.*, 2004). Além disso, homólogos desse receptor em *Arabidopsis thaliana* (AtNIK) também demonstraram capacidade de interagir com NSPs de begomovírus demonstrando que a interação com NIKs é conservada entre NSPs de begomovírus (Fontes *et al.*, 2004).

A proteína NIK (At5g16000) possui 638 resíduos de aminoácidos e é estruturalmente relacionada com os membros da Família RLK (Receptor-Like Kinase) de plantas, cujos membros apresentam atividade de serina/treonina cinases (Fontes *et al.*, 2004). Em *Arabidopsis*, NIK atua como receptor transmembrana de uma via de sinalização antiviral (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). A interação de NSP com o domínio cinase de NIK inibe sua atividade de autofosforilação e fosforilação de substratos sugerindo o envolvimento NIK em vias de resposta de defesa antiviral (Fontes *et al.*, 2004).

Carvalho *et al.* (2008) demonstraram que, em folhas de tabaco infectadas com begomovírus, a superexpressão de AtNIK1 diminuiu a inibição gerada por NSP na sua atividade superando, assim, o efeito inibitório causado por essa proteína viral. Além disso, a expressão aumentada de NIK1 em tomateiros atenuou os sintomas associados à infecção por begomovírus. No entanto, a efetividade dessa via de sinalização mediada por NIK contra a infecção por geminivírus é restrita, já que NSP suprime a atividade de NIK e porque a ativação da via parece ser dependente da infecção (Brustolini *et al.*, 2012).

A região no domínio cinase de NIK1 em que NSP se liga foi elucidada e se trata de um fragmento formado por 80 aminoácidos que abrange a alça de ativação (A-loop) e o sítio ativo da enzima (Fontes *et al.*, 2004). A fosforilação de resíduos presentes no A-loop constitui um mecanismo regulatório importante para a atividade de tirosina- e serina/treonina cinases (Nolen *et al.*, 2004). O alinhamento das sequências dos domínios cinases de membros da subfamília LRR-II-RLK e do receptor IRAK de humanos evidenciou que os resíduos de treonina 468, 469 e 474 presentes no A-loop de NIK1 são altamente conservados. Além disso, esse alinhamento evidenciou que a treonina 474 do A-loop de NIK está alinhada com o resíduo de treonina 468 da proteína SERK (Santos *et al.*, 2009), cuja fosforilação é essencial para ativação dessa cinase (Shah *et al.*, 2001).

No intuito de verificar o efeito desse possível sítio de fosforilação na atividade de NIK e o reflexo da sua função no contexto da via antiviral, Santos *et al.* (2009) construíram um mutante de AtNIK (T474D), cuja treonina 474 foi substituída por um resíduo de ácido aspártico. Esse aminoácido possui uma carga negativa permanente presente no seu grupo hidroxila ionizado que mimetiza o

estado ativado da enzima. Verificou-se, posteriormente, que este mutante apresenta uma hiperatividade de cinase quando comparado a atividade normal de NIK e, em ensaios de fosforilação, o mutante T474D diminuiu o efeito inibitório imposto por NSP na atividade de autofosforilação de NIK. Além disso, quando superexpresso transientemente em folhas de tabaco, esse mutante possui uma capacidade maior do que AtNIK1 de realocar seu substrato endógeno rpL10A para o núcleo das células vegetais. Todas essas características peculiares associadas ao mutante superativo de NIK faz dele o candidato mais atraente para ser explorado como alvo de resistência ou tolerância à infecção por begomovírus. Devido à importância dessas informações no âmbito da via de sinalização antiviral mediada por NIK, os objetivos deste trabalho foram caracterizar bioquímica e molecularmente a expressão ectópica do mutante NIK1-T474D bem como avaliar a eficiência desse mutante em combater a infecção por geminivírus.

II- MATERIAL E MÉTODOS

1 - Construções de DNA

O plasmídeo recombinante pDON-AtNIK1 (Fontes *et al.*, 2004), contendo o cDNA de NIK1 no vetor de entrada pDONR201 do sistema GATEWAY (Invitrogen Life Technologies, Inc.), foi utilizado como molde em reações de PCR para obtenção de mutações sítio-dirigidas, seguindo a metodologia de *Gene Tailor Site Directed Mutagenesis System* (Invitrogen). Nesse caso, o plasmídeo recombinante foi previamente metilado e posteriormente, os fragmentos específicos de DNA foram amplificados repetidamente por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando oligonucleotídeos específicos parcialmente sobrepostos. Esses oligonucleotídeos (Tabela 1 - anexo) possuem substituições de nucleotídeos em posições específicas a fim de produzir sequências mutantes de NIK. Tais substituições são: (i) treonina 474 para ácido aspártico (T474D) e (ii) substituição dupla envolvendo a troca da glicina 473 para valina e da treonina 474 para alanina (G473A/T474A). Os produtos da amplificação foram purificados em gel de agarose 1% e usados para transformação de *E. coli* estirpe DH5 α por choque térmico. A seleção dos transformantes foi realizada em placas de petri contendo meio LB sólido com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina. Os transformantes foram confirmados por PCR (Sambrook *et al.*, 1989) com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene e do vetor (Tabela 1 e 2, anexo). Os clones resultantes pDON-NIK1T474D (pUFV613) e pDON-NIK1G473V/T474A (pUFV612) foram confirmados por seqüenciamento.

Os clones resultantes contendo as versões mutantes de NIK1 (mutante T474D e o mutante duplo NIK1G473V/T474A), bem como o clone contendo a versão normal de NIK1, foram transferidos do vetor de entrada para o vetor binário de transformação de plantas pK7FWG2 resultando nos clones pK7F-NIK1 (pUFV1071), pK7F-NIK1T474D (pUFV643), pK7F-NIK1G473V/T474A (pUFV642). Esses clones possuem os cDNAs de NIK1 e das suas versões mutadas sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S.

2 - Material vegetal, condições de crescimento e transformação de plantas

Utilizou-se *A. thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) como tipo selvagem e a linhagem nocaute para NIK1 (*nik* - Salk_060808; Fontes *et al.*, 2004) como controle e para transformação de cDNAs mutados do receptor NIK1. Sementeiras foram feitas em placas contendo meio MS 1/2 força (Murashige & Skoog, 1962) e incubadas a 22°C, com fotoperíodo de 16 horas/luz e, posteriormente, transplantadas para vaso.

Os clones pK7F-NIKT474D, pK7F-NIK1G473V/T474A (descritos anteriormente) e pK7F-NIK1 (Fontes *et al.*, 2004) foram utilizados para transformação, por eletroporação, da *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101. Colônias transformadas foram confirmadas por PCR utilizando oligonucleotídeos para o promotor 35S de CaMV e para extremidade 3' do transgene NIK1 (Tabela 2, anexo) resultando nos clones pUFV670, pUFV653 e pUFV 1071, respectivamente. As colônias de *Agrobacterium* contendo as construções pK7F-NIKT474D, pK7F-NIK1G473V/T474A e pK7F-NIK1 foram separadamente inoculadas em 4 mL de meio LB líquido seletivo (100 mg.L⁻¹ de espectinomicina) por 24 horas a 28°C. Em seguida, os 4 mL foram inoculados em 250 mL de LB seletivo, que foram incubados por 24 horas a 28°C. Após período de incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação a 8000 x g por 10 minutos e ressuspensas em 250 mL de sacarose 5% contendo Silwett L-77 2% (v/v). A solução foi usada para transformar a linhagem de *Arabidopsis* mutante *nik* pelo método de agroinfiltração floral (Bechtold *et al.*, 1993). Sementes das plantas submetidas ao protocolo de transformação foram semeadas em meio MS 1/2 força contendo 50 µg.mL⁻¹ 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.

3 - Extração de RNA total das plantas

Para isolamento de RNA total, folhas de *Arabidopsis* foram maceradas em nitrogênio líquido e aproximadamente 200 mg do tecido vegetal foram homogeneizados com o reagente TRIZOL (Invitrogen). Incubou-se à temperatura ambiente, por 5 minutos, e adicionaram-se 200 μL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada manualmente por 15 segundos, incubada à temperatura ambiente por 3 minutos, e submetida à centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, livre de RNase, e foram adicionados 500 μL de isopropanol. Em seguida, incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) e centrifugado a 7.500 x g por 10 minutos. Em seguida, o material foi seco à temperatura ambiente por, aproximadamente, 10 minutos e os *pellets* ressuspensos em 20 μL de água livre de RNase e estocados a -80°C. A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão NBC, corado com brometo de etídeo 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4 - Análise da expressão por RT-PCR e qRT-PCR

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific, a 260 nm, e sua concentração expressa em $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Para a obtenção do cDNA, 2 μg do RNA total foram utilizados como molde, juntamente com 5 μM do oligonucleotídeo oligo dT e 0,5 mM de dNTPs, em um volume final de 15 μL . A mistura foi aquecida a 70°C por 5 minutos e depois imediatamente incubada no gelo. Em seguida, foi adicionado o tampão da enzima transcriptase reversa (Invitrogen; Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 3 mM, MgCl₂ 75 mM e DTT 10 mM), para um volume final de 20 μL . A mistura foi mantida a 37°C, por 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 μL de M-MLV RT Transcriptase Reversa (Invitrogen Life Technologies, Inc.), incubando-se a 37°C por 1 hora. A enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos.

Para a reação de PCR, foram utilizados 1 μL de DNA, 0,1 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada um dos oligonucleotídeos específicos para os genes NIK1 normal e mutado (Tabelas 1 e 2, anexo), tampão (MgCl₂ 2,0 mM, tris-HCl 20 mM pH

8,4, KCl 50 mM) e 1 μ L de Taq DNA polimerase, em um volume final de 25 μ L. As condições da reação adotadas foram: 3 minutos a 94° C, seguido de 30 ciclos (45 segundos a 94°C, 1 minuto e 30 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C), e posteriormente 10 minutos a 72°C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador Applied Biosystems e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) e corado com brometo de etídeo 0,1 μ g.mL⁻¹.

Para a análise de expressão por reação de polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR) foram construídos oligonucleotídeos específicos para a proteína NIK1, para actina e genes de resistência (Tabelas 2 e 3, anexo) utilizando o programa Primer Express 3.0. As reações de qRT-PCR foram realizadas após validação dos oligonucleotídeos em ABI7500 (Applied Biosystems) usando 500 femtomols dos oligonucleotídeos com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O RNA do gene para actina foi utilizado como controle endógeno para a normalização dos dados. O método 2^{-C_t} foi utilizado para a quantificação da expressão gênica.

5 - Método de sequenciamento de RNA e análise dos dados

Plântulas da linhagem transgênica de 35S::pK7FNIK1-T474D de *Arabidopsis* (transformante T474D-4 e T474D-6) e da linhagem controle Col-0, crescidas durante dez dias em placas de petri contendo meio MS. Em seguida foram transplantadas para vasos contendo substrato e mantidas a 22 °C sob condições de dia curto. Dez dias após a transferência das plantas para o substrato, foi extraído o RNA total das folhas das linhagens citadas usando o reagente TRIZOL. Para o sequenciamento de RNA foram usadas duas replicatas das linhagens constituídas por 3 plantas cada amostra.

Para a obtenção do RNA mensageiro usando as amostras de RNA total foi usado o protocolo Illumina TruSeq. A biblioteca escolhida foi a “pair-ended”. Os dados do sequenciamento foram obtidos usando o equipamento Illumina HiSeq 2000 da Empresa Macrogen. Para a filtragem das sequências usou-se os seguintes

parâmetros: máximo de uma base abaixo da qualidade de 5 nas primeiras 30 bases, uma qualidade de cobertura de 10, sem “N” e não mais que 35 bases idênticas. A análise da expressão diferencial de gene foi realizada usando o pacote *edgeR* do ambiente R/Bioconductor (Robinson *et al.*, 2010). Os dados brutos foram normalizados usando o fator TMM (Robinson & Oshlack, 2010). Os parâmetros de dispersão foram estimados pelo método Tagwise. A expressão diferencial foi determinada usando o “p-value” ajustado por FDR (q-value) com o limite até 0,05. O processo de mapeamento dos “reads” (read mapping process) foi executado usando o programa Bowtie 2 (Langmead *et al.*, 2009) e o conjunto total de transcritos foram obtidos do consorcio de anotação e sequenciamento da *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org> - TAIR). A ontologia dos genes foi realizada usando os pacotes GSEABase e GOstats do R/Bioconductor. As análises de agrupamento foram feitas usando o pacote *pvclust* (agrupamento hierárquico com “p-values” via “Multiscale Bootstrap Resampling”) usando o método Ward’s (Ward, 1963). Os resultados foram armazenados em um banco de dados criado em PostgreSQL, e uma página na web foi criada para permitir o acesso aos dados (<http://bioinfo-1.bioagro.ufv.br/fonteslab/arabidopsisdB>).

6 - Imunoprecipitação

O extrato protéico foi obtido a partir de 0,2g de folhas de *Arabidopsis* linhagem Columbia e nocaute *nik1* transformada com 35S:: pK7FNIK1T474D-GFP (transformante T474D-4 e T474D-6) e as proteínas foram imunoprecipitadas utilizando *μMACS Epitope Tag Protein Isolation Kits* (Miltenyi Biotec), conforme instruções do fabricante. As proteínas imunoprecipitadas foram resolvidas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, contendo dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* - SDS-PAGE 10%). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada em tampão TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 140 mM) contendo 5% (p/v) de caseína e incubada, posteriormente, com anti-GFP-HRP (Miltenyi Biotec) por 10 horas à temperatura ambiente. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando *SuperSignal West Pico*

Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) conforme recomendações do fabricante.

7 - Determinação dos teores de clorofila

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi realizada segundo Lichthenthaler, 1987. Aproximadamente 100 mg de folhas das linhagens de *Arabidopsis* col-0, nocaute de NIK (*nik*), superexpressando 35S::pK7FNIK1 (NIK1-5 e NIK-8) ou os mutantes 35S:: pK7FNIK1-T474D (transformantes T474D-4 e T474D-6) e 35S:: pK7FNIK1-G473V/T474A (transformantes G473V/T474A-1 e G473V/T474A-2) foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em acetona 80% (v/v) na presença de 1 mg de Na₂CO₃. Após a separação dos sedimentos por filtração, o extrato foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda 470, 646,8 e 662,2 nm. O resultado final considera o valor de massa fresca utilizada no ensaio para cada amostra.

8 - Marcação *in vivo* de proteínas das folhas de Arabidopsis

Sementes de *Arabidopsis* das linhagens Col-0, *nik*, superexpressando 35S::pK7FNIK, dos mutantes 35S::pK7FNIK1-T474D e 35S::pK7FNIK1-G473V/T474A foram esterilizadas e submetidas à temperatura de 4°C por dois dias no escuro para quebrar a dormência. Em seguida, as sementes foram plaqueadas em placas contendo meio MS e mantidas a 22 °C sob luz branca contínua. Folhas das plântulas crescidas por 2 semanas foram excisadas, pesadas e incubadas em 1 mL de solução nutriente contendo 50 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol e 20 µCi de [³⁵ S]-metionina (EasyTag™ Protein Labeling Mix, [³⁵ S]-, 2 mCi (74 MBq), Perkin Elmer) por 2 horas a temperatura ambiente. Então, as proteínas totais foram extraídas com tampão de amostra SDS, fervidas e centrifugadas a 1800 x g por 10 minutos. Quantidades iguais de proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE. Após coloração com *Comassie brilliant blue*, o gel foi seco e as proteínas marcadas foram visualizadas por autoradiografia. Proteínas presentes no gel foram normalizadas pela subunidade maior da rubisco. A intensidade da

radioatividade incorporada nas bandas protéicas foi quantificada por fosfoimagem e foram também normalizadas pelo teor de clorofila.

9 - Ensaio de coloração

9.1 - Detecção de H₂O₂ por DAB (Diaminobenzidina)

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em plântulas de col-0 e dos transformantes de NIKT474D foi avaliada usando o reagente 3,3-diaminobenzidina (DAB) segundo Weigel & Glazebrook (2002). Plântulas crescidas em meio MS ½ força foram destacadas após 12 dias de plaqueamento e imediatamente submersas em solução contendo 1mg.mL⁻¹ de DAB, pH 3,8, e foram mantidas nessa solução por 8 horas. Após esse período, foram descoradas com etanol 100% por 3 horas e observadas em estereoscópio (Zeiss, Stemi 2000-C).

9.2 - Detecção de morte celular por Azul de Tripán

A morte celular foi monitorada usando o reagente azul de Tripán, segundo Weigel & Glazebrook (2002). Diluiu-se 2,5 mg.mL⁻¹ de azul de Tripán em uma solução de lactofenol (33,33% de ácido láctico, 33,33% de glicerol e 33,33% de água). Posteriormente, foram adicionados à solução 2 volumes de etanol 100%. Plântulas de col-0 e dos transformantes de 35S::pK7FNIK1-T474D crescidas em meio MS ½ força por 12 dias foram imersas nessa solução por 16 horas. Em seguida, elas foram descoradas em solução de cloral hidratado (2,5g.mL⁻¹) e mantidas em glicerol 70%. As plântulas descoradas foram observadas em estereoscópio (Zeiss, Stemi 2000-C).

9.3 - Detecção de morte celular por azul de Evans

A morte celular foi também avaliada usando o reagente azul de Evans. Plântulas de col-0 e dos transformante de 35S::pK7FNIK1T474D crescidas por 12 dias em placas contendo meio MS foram submersas em Solução de azul de Evans 2% (p/v) por 10 minutos (Mergemann & Sauter, 2000). Em seguida, as elas foram lavadas 4 vezes em água e observadas em estereoscópio (Zeiss, Stemi 2000-C).

10 - Infecção de Arabidopsis com CaLCuV (*Cabbage leaf Curl virus*) e ensaios de infectividade

As sementes de plantas Col-0, 35S::pK7FNIK1, 35S::pK7FNIKT474D e 35S::pK7FNIKG473V/T474A foram esterilizadas e plaqueadas em meio MS ½ força, sem antibiótico. Após 2 semanas, 25 plantas de cada linhagem foram transplantadas para vasos individuais, contendo substrato. Quando atingiram o estágio de sete folhas, as plantas foram inoculadas com os componentes A e B do vírus CaLCuV por meio de biobalística (Schaffer *et al.* 1995). Para isso, o DNA plasmidial dos clones CaLCuVA002 e CaLCuVB002, contendo repetições parciais de cada um dos componentes, respectivamente, foi extraído utilizando o “Plasmid Midi Kit” (Qiagen), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade e integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 1% (p/v) e a concentração foi avaliada por espectrofotometria a 260 nm. Aproximadamente 10 mg de cada componente de DNA foram precipitados com micropartículas de tungstênio na presença de 1M de CaCl₂ e 15M de espermidina e lavados com etanol absoluto. Cada preparação foi distribuída em 5 membranas carreadoras. As membranas preparadas foram encaixadas no acelerador de partículas e lançadas, sob vácuo formado com gás hélio, a uma aceleração de 160 psi, contra as plantas de Arabidopsis citadas acima. Como controle negativo, cinco plantas de cada linhagem foram bombardeadas somente com micropartículas de tungstênio. As plantas bombardeadas foram mantidas a 22°C com fotoperíodo de 16 horas.

11 - Diagnóstico molecular da infecção viral

11.1 - Extração de DNA das plantas e confirmação por PCR

Uma folha de cada planta inoculada com vírus foi coletada a cada sete dias, após a inoculação, até 28 dias. A folha foi macerada em nitrogênio líquido, em microtubos com auxílio de pistilos. A extração de DNA foi processada de acordo com Dellaporta *et al.* (1983). Para confirmar a presença do genoma viral nas plantas, o DNA extraído foi usado como molde em reação de PCR com oligonucleotídeos que amplificam fragmentos específicos do componente B de begomovírus (Tabela 2, anexo) (Rojas *et al.*, 1993). Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo na concentração de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

11.2 - Análises dos dados do ensaio de infecção

A porcentagem de plantas infectadas foi avaliada, de acordo com a presença de DNA viral, a cada sete dias. Os dados foram plotados em um gráfico (porcentagem de plantas infectadas X dias pós-infecção), juntamente com o desvio padrão entre as repetições usando o programa Microsoft Office Excel .

III - RESULTADOS

1 - Caracterização molecular das plantas transgênicas expressando T474D

A proteína de movimento NSP de CaLCuV (*Cabbage leaf curly vírus*) e de ToYSV (*Tomato yellow spot vírus*) interage estavelmente *in vitro* com o domínio cinase de NIK de *Arabidopsis* (Fontes *et al.*, 2004; Brustolini *et al.*, 2012). Além disso, a substituição da treonina 474 por ácido aspártico presente no A-loop da enzima não impede a interação entre NSP e o domínio cinase de NIK, mas diminui a inibição provocada por NSP na atividade de NIK (Brustolini *et al.*, 2012). Estas características, atividade aumentada de cinase e efetividade em superar a inibição causada por NSP fazem do mutante superativo de NIK (NIK1-T474D) o candidato mais apropriado para se desenvolver uma linhagem de planta transgênica mais resistente ou tolerante à infecção por begomovírus. Desse modo, no intuito de se avaliar a dimensão da função que o receptor NIK1 superativo desempenha na resposta de defesa antiviral *in vivo*, ensaios de complementação de função foram conduzidos por meio de expressão da proteína NIK “normal” ou da proteína NIK superativa (T474D) em plantas de *Arabidopsis* nocautes para o gene NIK1 (salk_060808). As plantas transformadas com cada uma das construções foram validadas por PCR (dado não mostrado) e a expressão de cada transgene em folhas das linhagens transformadas foi confirmada por RT-PCR em tempo real (Fig. 1a). A linhagem nocaute foi utilizada como um controle negativo para a expressão do gene NIK.

Para verificar se as plantas transformadas com o transgene superativo de NIK expressam estavelmente a proteína foi realizado um ensaio de imunoprecipitação (Fig. 1b) utilizando o extrato protéico obtido das folhas dos transformantes de *Arabidopsis* expressando NIK1-T474D. A proteína mutante fusionada à GFP foi imunoprecipitada utilizando anti-GFP e detectada por *western blotting* com o mesmo anticorpo. O acúmulo de NIK1-T474D detectada nos dois transformantes independentes (T474D-4 e T474D-6) comprova que ambos estão produzindo a proteína mutante de uma forma estável.

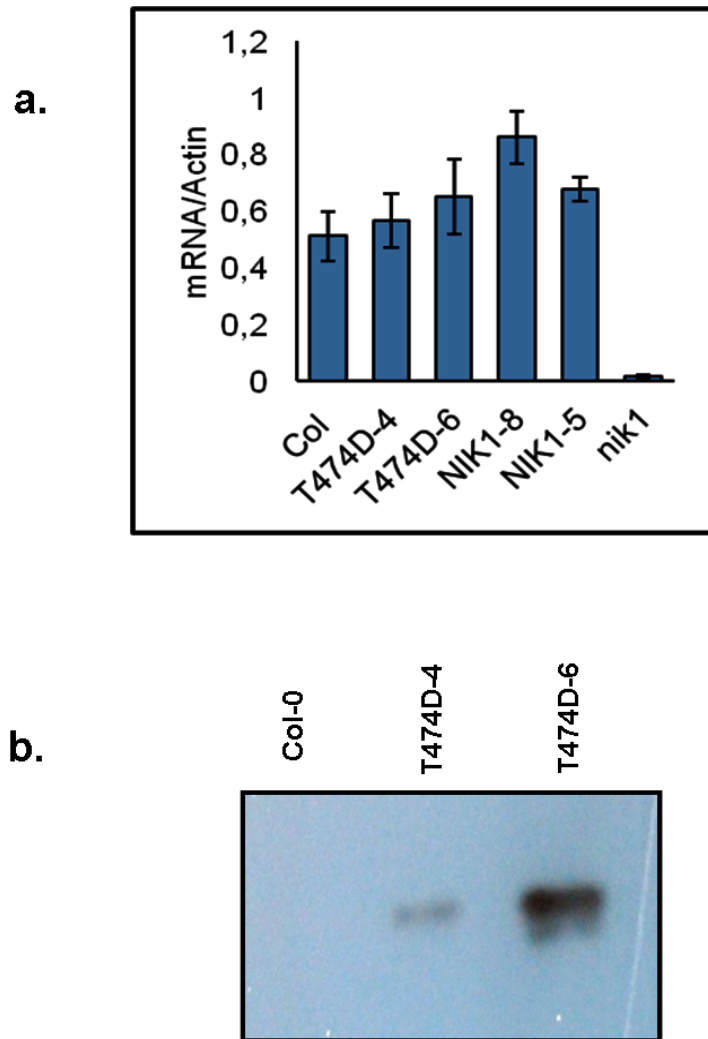


Figura 1. Avaliação da expressão gênica de NIK1-T474D em folhas de Arabidopsis. **a.** Acúmulo do transcrito T474D em linhagens transgênicas (geração R2). A expressão de T474D ou NIK1 nas folhas das linhagens transgênicas foi monitorada por RT-PCR quantitativo. A barra de erros representa o desvio intervalo de confiança da média de três repetições. **b.** Acúmulo da proteína NIK superativa fusionada a GFP nas linhagens transgênicas. Proteínas totais foram extraídas de folhas de Col-0 e dos transformantes independentes T474D-4 e T474D-6 e, posteriormente, foram imunoprecipitadas e submetidas a imunoblot usando o anticorpo anti-GFP.

2 - Superexpressão de NIK1-T474D em Arabidopsis causa impacto negativo no desenvolvimento das plantas transgênicas

A análise fenotípica das linhagens de Arabidopsis transformadas com NIK1, NIK1-T474D ou com a cinase inativa NIK1-G473V/T474A evidenciou que a expressão ectópica da NIK1-T474D em Arabidopsis provoca um grande atraso no crescimento em comparação com as demais linhagens avaliadas (Fig. 2a). Esse efeito deletério no desenvolvimento foi observado ao longo de quatro gerações (R0 – R3) dessa linhagem expressando NIK superativa. No entanto, a determinação do conteúdo de clorofila presente nas folhas de cada uma dessas linhagens (Fig. 2b) mostrou que não houve diferença entre os teores de clorofila apresentados pelos mutantes superexpressando NIK1-T474D e pela planta controle Col-0. Dessa forma, apesar de apresentar um desenvolvimento mais lento, os dados indicam que a linhagem T474D não deve ter sua capacidade fotossintética comprometida em relação às demais. Em tomates transgênicos superexpressando o mutante NIK1-T474D, a taxa de fotossíntese medida foi similar à apresentada pela linhagem controle não transformada (Brustolini *et al.*, 2012).

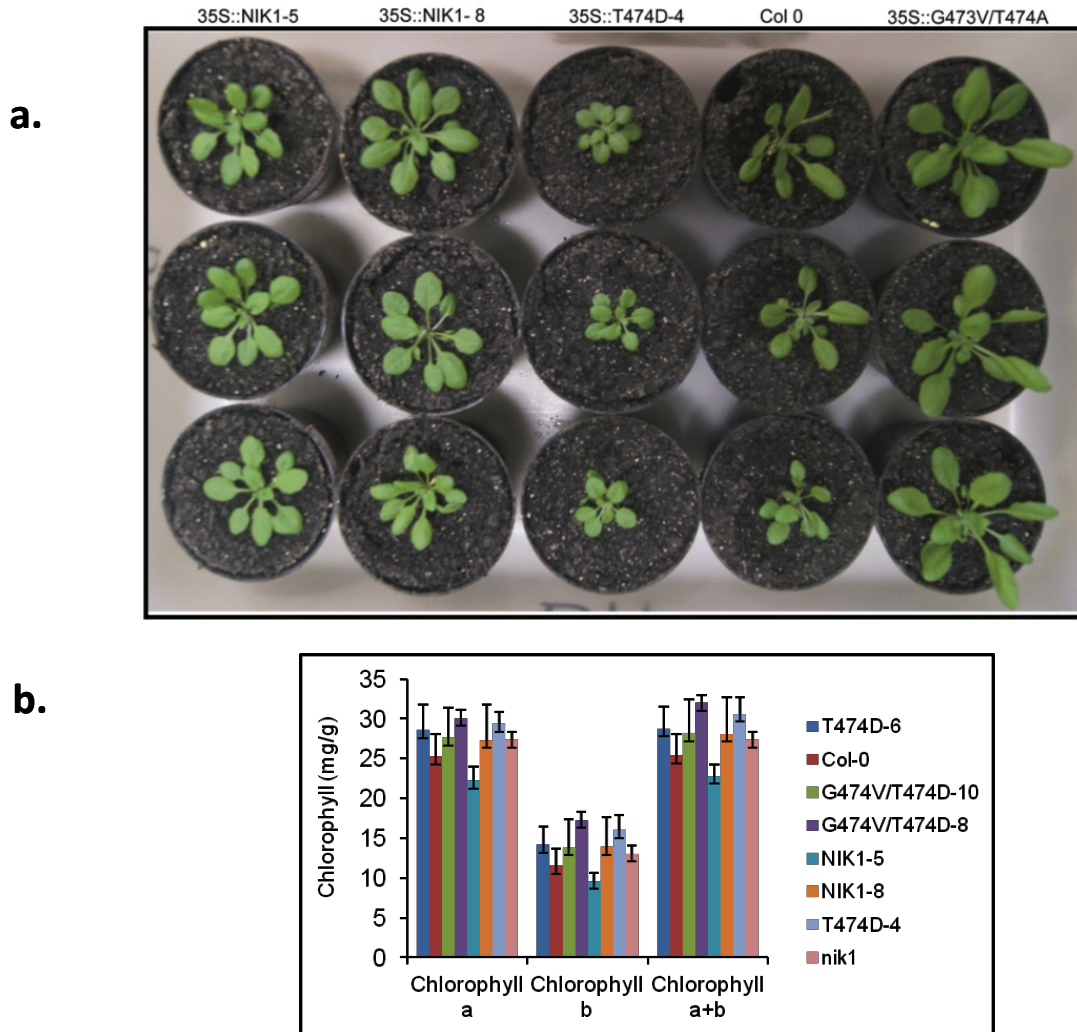


Figura 2. Análise fenotípica e determinação do teor de clorofila das linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o receptor NIK1 ou mutantes de NIK1. a. Fenótipo apresentado pela linhagem selvagem (Col-0) e nocautes *nik1* transformada com NIK1 (NIK1-5 e NIK1-8), T474D (T474D-4) ou pelo duplo mutante NIK1-G4743V/T474A (NIK1 com atividade de cinase inativa). Plantas transgênicas (geração R2) cresceram em substrato à temperatura de 22°C sob condições de dia curto e foram fotografadas duas semanas após terem sido transplantadas. **b.** Conteúdo de clorofila das linhagens de NIK1. A clorofila total, clorofilas *a* e *b* foram determinadas a partir de secções foliares das linhagens Col-0, nocaute *nik1* e das transformadas com mutantes de NIK1 como indicado. A barra de erros representa o intervalo de confiança da média de três repetições. O conteúdo de clorofila não diferiu entre Col-0 e as linhagens transgênicas T474D-4 e T474D-6 e foi usado para normalizar o ensaio de marcação *in vivo* de proteínas foliares de *Arabidopsis* com [³⁵S]Met (Fig.4).

3 - Regulação negativa da tradução global pela expressão ectópica do mutante T474D em Arabidopsis

O desenvolvimento das plantas está diretamente relacionado aos processos de tradução protéica (Schippers & Mueller-Roeber., 2010; Horiguchi *et al.*, 2012). Uma análise da variação global de expressão gênica por sequenciamento do RNA utilizando o protocolo Illumina revelou que a expressão ectópica de NIK1-T474D em tomateiros (Brustolini *et al.*, 2012) e Arabidopsis (Fig. 3) causou uma regulação negativa na expressão de genes componentes da maquinaria de tradução como proteínas ribossomais, fatores de iniciação de tradução e de proteínas secretórias. Além disso, para verificar se a síntese de proteínas também foi alterada pela ativação constitutiva de NIK1 nas linhagens T474D, folhas deste mutante, da linhagem nocaute (*nik*), de Col-0 e do mutante superexpressando NIK1 “normal” foram marcadas *in vivo* com [³⁵S]-metionina (Fig.4a e 4b). Na linhagem de Arabidopsis superexpressando NIK1-T474D (transformantes T474D-4 e T474D-6), a ativação constitutiva do receptor NIK promoveu uma redução significativa na quantidade de novas proteínas sintetizadas em comparação à quantidade de proteínas produzidas pelas folhas de plantas superexpressando NIK e pela linhagem selvagem Col-0. Esses resultados corroboram as observações feitas pela análise dos fenótipos apresentados na Figura 2a em que o mutante T474D apresentou um menor crescimento em relação às demais linhagens. Essa diminuição da síntese protéica deve estar envolvida, pelo menos em parte, ao redirecionamento energético para sustentar os mecanismos relacionados à defesa antiviral mediada pela expressão constitutiva de NIK.

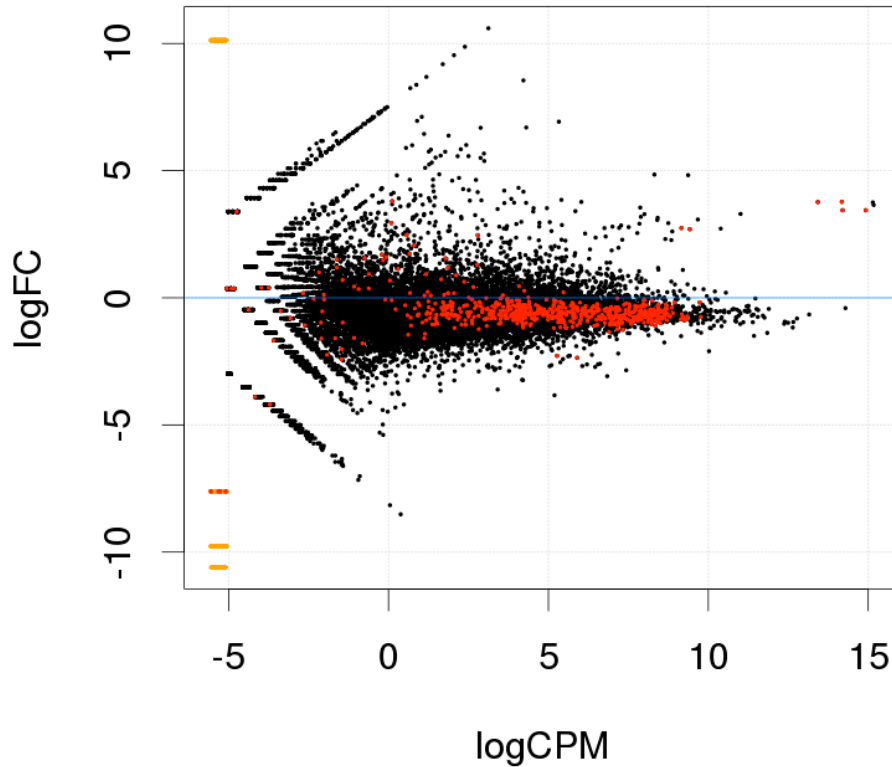


Figura 3. Representação da regulação negativa dos genes relacionados à maquinaria de tradução. O gráfico representa o logaritmo da razão do nível de expressão versus o logaritmo da concentração, e cada ponto representa um gene. O contraste avaliado corresponde ao perfil de expressão de genes da linhagem de *Arabidopsis* superexpressando NIK1-T474D versus a linhagem Col-0. O RNA das folhas dessas linhagens foi extraído duas semanas após terem sido transplantadas para vasos contendo substrato. Os pontos espalhados no lado esquerdo representam genes que foram somente observados em um dos grupos das amostras replicadas, e os pontos vermelhos indicam genes que expressam componentes ribossomais, proteínas relacionadas ao aparato secretório da célula e genes relacionados à síntese protéica.

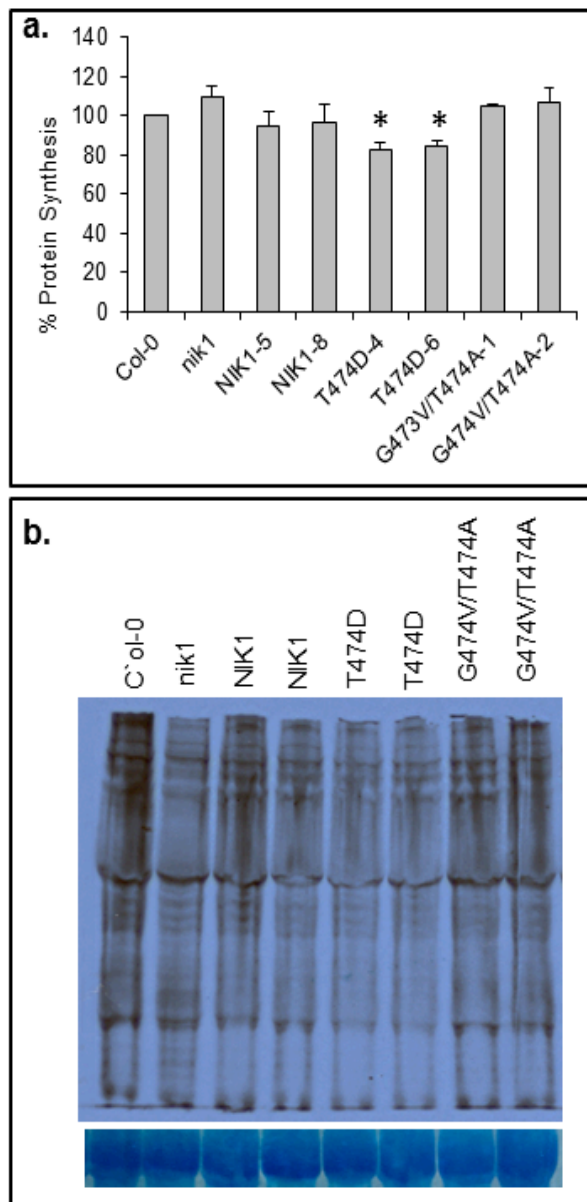


Figura 4. Downregulação da síntese protéica em linhagens de arábidoopsis superexpressando NIK1-T474D. **a.** A marcação *in vivo* das proteínas de folhas com [35S]-Metionina foi realizada em linhagens de Arabidopsis com 20 dias após a germinação. O extrato contendo proteínas totais foi fracionado por SDS-PAGE e as bandas radioativas foram quantificadas por densitometria da auto-radiografia. A porcentagem da marcação foi normalizada através do conteúdo de clorofila das folhas. A barra de erros representa o desvio padrão da média de três repetições. O asterisco indica diferença significativa de acordo com teste t ($P < 0,05$). **b.** proteínas presentes no gel foram ajustadas pela banda da subunidade maior da rubisco corada com *Coomassie Brilliant Blue*.

4 - Expressão ectópica de T474D induz a superexpressão de genes do sistema imune e um fenótipo de morte celular em plantas transgênicas

O receptor NIK atua como um autêntico transdutor de sinais relacionado a mecanismos de resposta imune nas células (Fontes *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008). Brustolini *et al.* (2012) reportaram que a resposta mediada pela NIK1 superativa e as alterações moleculares provocadas na células pela infecção por geminivírus compartilham um mecanismo semelhante, já que o transcriptoma induzido por infecção viral na linhagem selvagem de tomate é similar ao transcriptoma apresentado pela planta mutante T474D não submetida a infecção. Paralelamente a esta informação, sabe-se que a infecção viral induz, nas células do hospedeiro, a expressão de genes de defesa (genes PR) e a indução de morte celular programada, fenômenos relacionados à via do ácido salicílico (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Dessa forma, com o objetivo de avaliar se a superexpressão de NIK1-T474D ativa respostas de defesa similar àquela elicitada por infecção viral mediada pela via do ácido salicílico, plantas Col-0 e plantas T474D de *Arabidopsis* foram submetidas à análise do perfil de expressão de genes de defesa (descritos na Tabela 3, anexo) por qRT-PCR (Fig 5).

Os resultados apontaram que genes relacionados à patogênese como PR1 (pathogenesis-related 1 – At4g33720) e PR5 (pathogenesis-related 5, Thaumatin – At4g11650) apresentaram uma forte indução, cerca de 100 e 160 vezes maior, em mutantes T474D em comparação com a expressão observada em plantas controle. Esses mesmos genes, que são marcadores clássicos de resposta de defesa desencadeadas pelo ácido salicílico (Pieterse & Van Loon, 2004), também foram “up-regulados” em *Arabidopsis* infectadas por CaLCuV (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008). Além dos genes PR, os resultados também mostraram uma acentuada “up-regulação” de genes relacionados à defesa nos mutantes superexpressando NIK1-T474D como: genes - NBS-LRR-like, Pto-like, TIR-NBS-LRR-like (Tabela 3, anexo). Brustolini *et al.* (2012) também demonstraram que plantas de tomates T474D apresentam um nível maior de expressão de genes relacionados ao sistema imune de plantas em comparação com a linhagem selvagem. Além disso, a análise proteômica comparativa dessas linhagens mostrou que o mutante T474D apresenta um maior acúmulo de proteínas identificadas como possíveis membros do sistema de defesa em plantas.

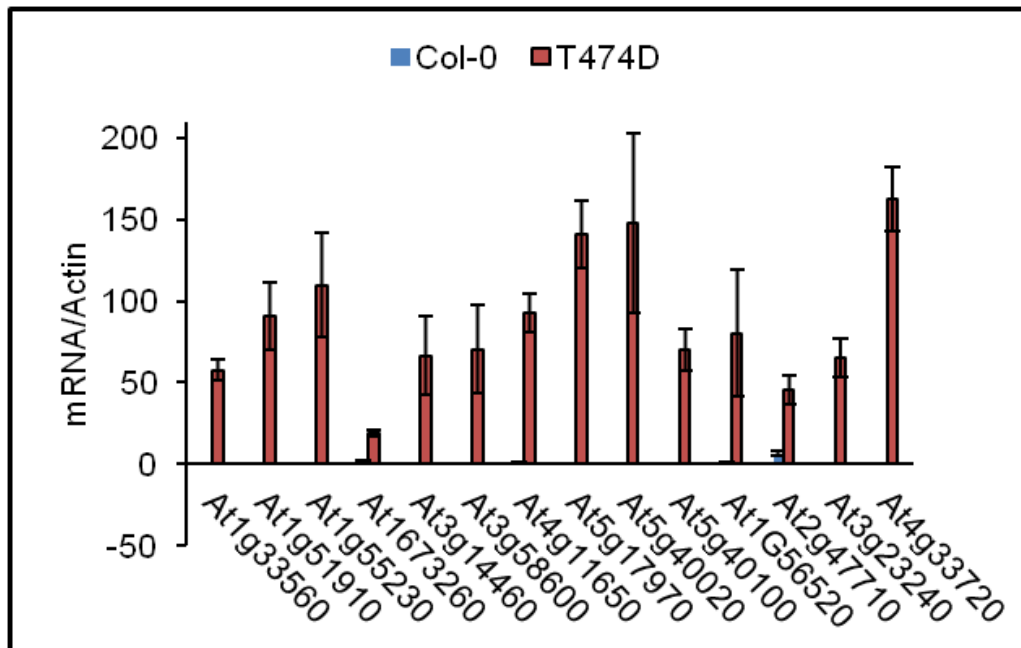


Figura 5. Expressão ectópica do mutante T474D induz a expressão de genes relacionados a resposta imune em Arabidopsis. O RNA total foi extraído de plantas de Arabidopsis crescidas em meio MS ½ força a 22 °C após 30 dias de plaqueamento. Os níveis relativos dos genes transcritos relacionados a resposta imune (como indicado) foram determinados por qRT-PCR. Valores foram normalizados pela expressão do gene endógeno actina. A barra de erros representa o intervalo de confiança da média de três repetições. A identidade dos genes está especificada na Tabela 3 (anexo).

Além do aumento da expressão de genes PR, a ativação da via do ácido salicílico induz a produção de espécies reativas de oxigênio, como H₂O₂, e morte celular programada (Rao *et al.*, 1997). Com o objetivo de verificar se a expressão ectópica de NIK1-T474D induz a produção de H₂O₂ e morte celular, a linhagem controle de Arabidopsis e dois transformantes independentes (T474D-4 e T474D-6) expressando NIK superativa foram submetidas à coloração histoquímica com DAB, que detecta produção de H₂O₂, azul de Evans e azul de Tripán, ambos corantes marcadores de morte celular nos tecidos. A figura 6 mostra que folhas das plantas mutantes superexpressando NIK1-T474D coradas do DAB apresentaram um maior acúmulo de H₂O₂ em comparação às folhas de Col-0. A coloração das folhas superexpressando NIK1-T474D com azul de Evans indicou

que a extensão com que ocorre morte celular nas folhas dos dois transformantes é maior do que em Col-0. O azul de Tripán além de corar nervuras nas folhas do mutante T474D-6, corou também células mortas confirmando que ocorre morte celular nas folhas dessa linhagem. Nas folhas da Col-0, somente nervuras foliares foram destacadas pelo azul de Tripán. Os resultados obtidos pela análise da expressão ectópica de NIK1-T474D em folhas de *Arabidopsis* interligam a via de sinalização mediada por NIK com a resistência adquirida sistêmica de plantas. A indução da expressão de genes PR, produção de H₂O₂ e morte celular são eventos característicos da resistência adquirida sistêmica via ácido salicílico e a ocorrência desses fenômenos em plantas superexpressando NIK1-T474D sugerem que, provavelmente, exista uma ramificação na via de sinalização mediada por NIK que produz um sinal de defesa que é transduzido na ativação de genes relacionados ao sistema imune de plantas.

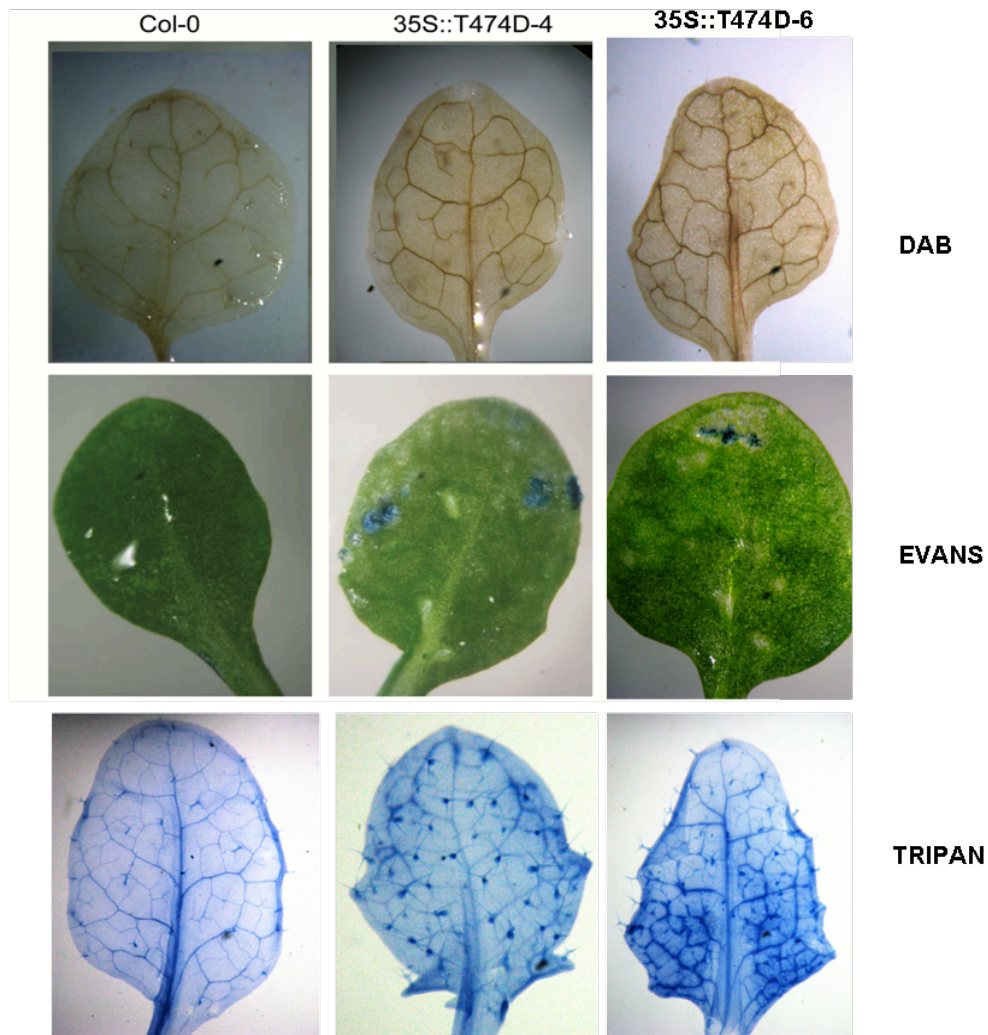


Figura 6. Expressão ectópica do mutante T474D induz morte celular em Arabidopsis. Ensaio de coloração histoquímica realizado em folhas das linhagens Col-0 e dos transformantes T474D-4 e T474D-6 crescidas por 12 dias em placas de petri contendo meio MS ½ força. Folhas foram tratadas com DAB (diaminobenzidina), azul de Evans e azul de Tripian e observadas em estereoscópio.

5 - Expressão ectópica de NIK1 T474D em Arabidopsis confere tolerância ao begomovírus CaLCuV

Com a finalidade de avaliar se a ativação constitutiva de NIK1 representa uma forma efetiva de se controlar a infecção por begomovírus, foi realizado um

experimento de infectividade por biobalística utilizando dois transformantes independentes superexpressando NIK1-T474D (T474D-4 e T474D-6). Da mesma forma, foram inoculadas também com DNA-A e DNA-B do CaLCuV (*Cabbage leaf Curl virus*), a linhagem selvagem (Col-0), dois transformantes superexpressando NIK1 (NIK1-5 e NIK1-8) e dois transformantes superexpressando a versão mutante de NIK1 cujas mutações suprimem totalmente a atividade de cinase do receptor (G473V/T474A-4 e G473V/T474A-10).

Por meio da análise dos sintomas das plantas e do acúmulo do DNA viral, foi avaliada a porcentagem de plantas infectadas ao longo do tempo após a infecção (Fig. 7). Plantas inoculadas somente com micropartículas de tungstênio foram usadas como controle negativo. 23 dias após inoculação do DNA viral, a linhagem selvagem Col-0 exibiu sintomatologia típica associada à infecção por CaLCuV como: redução no crescimento, clorose e deformação foliar (Fig. 7a). Apesar de ter sido detectado acúmulo de DNA viral em todas as linhagens submetidas ao ensaio de infectividade (Fig. 7b), plantas T474D infectadas (T474D-4 e T474D-6) não apresentaram sintomas aparentes associados à infecção (Fig. 7a) e o progresso da taxa de infecção dessas plantas se mostrou atrasado em comparação às demais linhagens avaliadas (Fig. 7c). As linhagens de *Arabidopsis* superexpressando a proteína NIK1 “normal” (NIK1-5 e NIK1-8) exibiram uma taxa de infecção maior quando comparadas aos mutantes T474D e similar a das plantas Col-0. Em contraste, a expressão da cinase inativa (G473V/T474A-4 e G473V/T474A-10) nas plantas nocautes foi associada a uma susceptibilidade maior a infecção a begomovírus quando comparada as demais linhagens (Fig. 7c).

A performance das linhagens superexpressando NIK1-T474D quando submetidas a infecção por geminivírus indica que expressão ectópica desse transgene gera um mecanismo de defesa mais efetivo nas plantas transformadas. Provavelmente, a ativação constitutiva do mutante T474D e sua capacidade em superar a inibição causada por NSP na atividade de cinase (Santos *et al.*, 2009; Brustolini *et al.*, 2012) são responsáveis pela maior tolerância das plantas transgênicas à infecção por begomovírus.

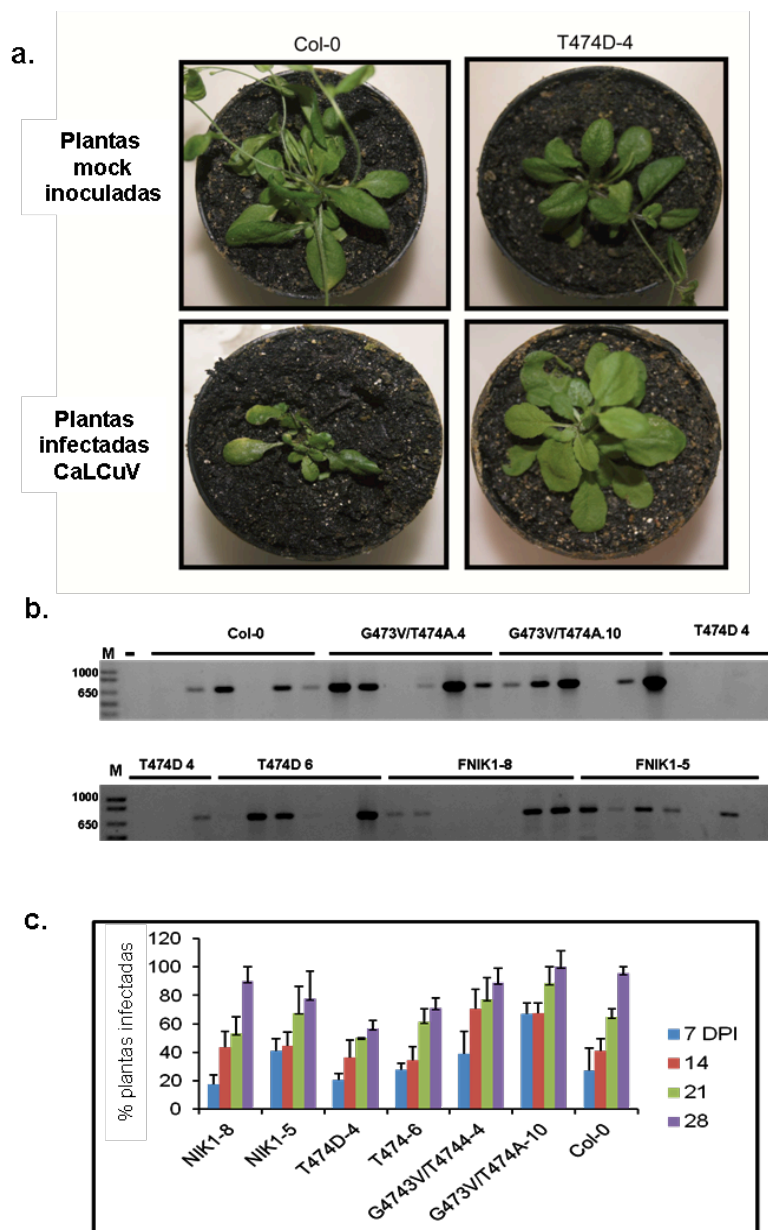


Figura 7. Tolerância da linhagem de Arabidopsis superexpressando NIK1-T474D à infecção por begomovírus. **a.** Sintomas associados à infecção por CaLCuV após 23 dias de inoculação viral em linhagens Col-0 e expressando T474D. O DNA-A e DNA-B virais foram introduzidos nas plantas por inoculação por biobalística. Acima, Col-0 (esquerda) e T474D (direita) são plantas bombardeadas somente com partículas de tungstênio, sem DNA viral. Abaixo, Col-0 (esquerda) e T474D (direita) são plantas infectadas por CaLCuV. **b.** Acúmulo do DNA viral em plantas infectadas. O DNA viral foi isolado de plantas Col-0 e de plantas expressando NIK1, NIK1-T474D ou NIK1-G473V/T474A, com 7 DPI, e diagnosticado por PCR com oligonucleotídeos para o componente B de begomovírus. **c.** Gráfico dos valores da porcentagem de plantas sistematicamente infectadas em diferentes dias pós-inoculação. O desvio padrão de três experimentos independentes foi determinado.

6 - O receptor de defesa immune NIK é amplamente distribuído no Reino vegetal

A Figura 8 mostra que o receptor NIK1 é amplamente encontrado no Reino vegetal existindo genes homólogos de AtNIK1 em muitas plantas de relevância econômica como tomate, arroz, soja, milho e sorgo. Especificamente, cDNAs que codificam homólogos de AtNIK1 já foram isolados em soja e tomate (Mariano *et al.*, 2004). Devido ao fato de NSPs de diferentes espécies de begomovírus serem capazes de interagir com NIKs de diferentes hospedeiros (Fontes *et al.*, 2004, Mariano *et al.*, 2004) e por NIK1 estar presente no genoma de várias espécies de plantas, as vantagens apresentadas pela superexpressão do mutante NIK1-T474D em *Arabidopsis* podem ser testadas em outras plantas. De fato, Brustolini *et al.* (2012) observaram que a expressão constitutiva de NIK1-T474D em tomates também está associada a regulação negativa de genes associados à maquinaria de tradução, ao aumento da expressão de genes relacionados ao sistema imune de plantas e a uma melhor performance quando a planta é submetida à infecção por begomovírus. No entanto, essa linhagem transgênica de tomate, diferentemente do fenótipo apresentado pela linhagem T474D de *Arabidopsis*, apresenta um desenvolvimento semelhante ao da linhagem selvagem, mesmo tendo uma diminuição global na tradução associada à expressão da NIK1-T474D.

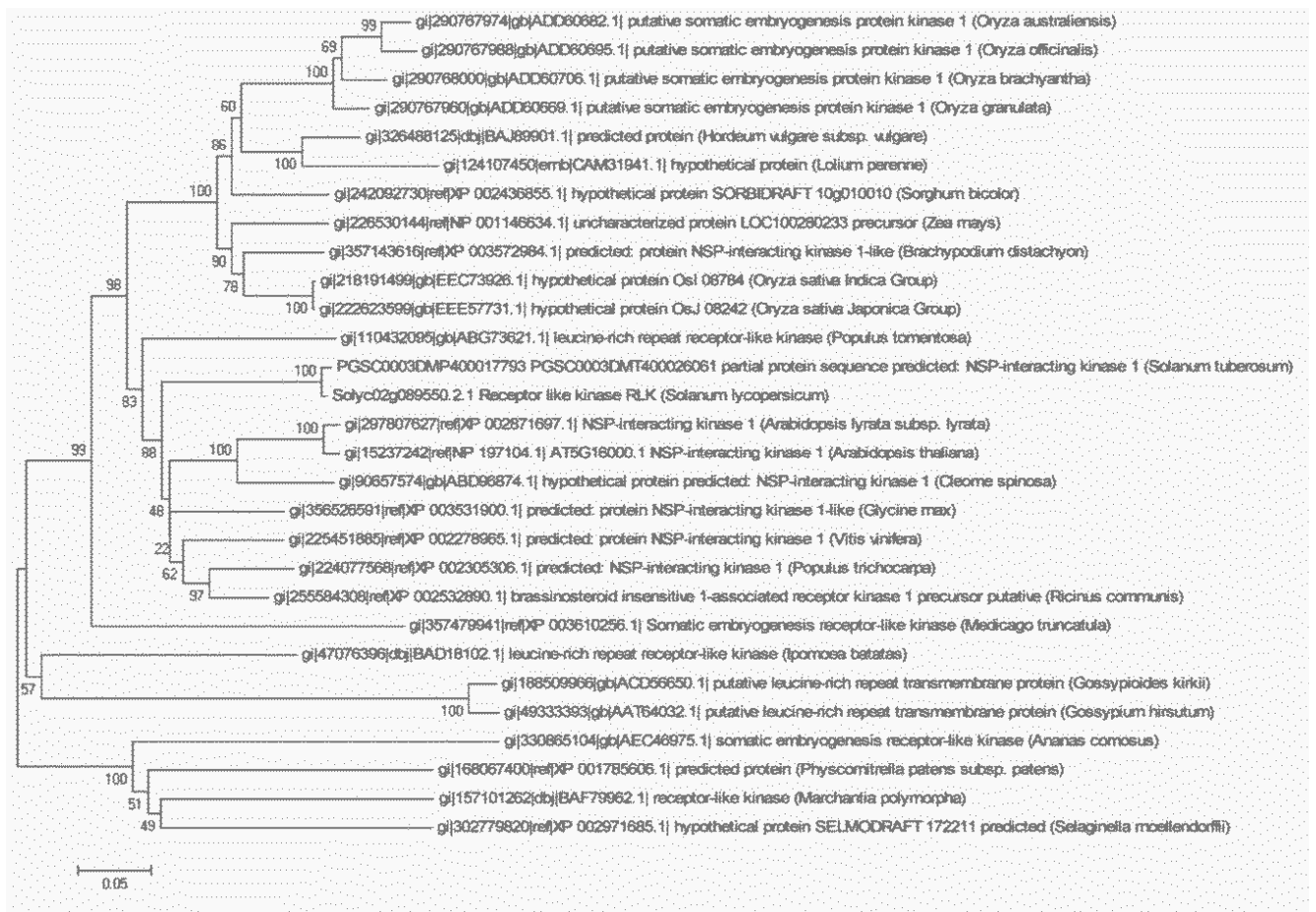


Figura 8. Árvore filogenética relacionando receptores NIKs de diferentes espécies de plantas. Árvore Neighbor Joining (NJ) com 10.000 replicações bootstrap de NIK1 entre 29 espécies de plantas. Esses dados foram obtidos usando NIK1 (*At5g1600.1*) de *A. thaliana* como molde no banco de dados do NCBI. O algoritmo BLAST foi realizado com os seguintes parâmetros: 0,5 e-value, e 71% de identidade máxima. O alinhamento foi feito no Muscle program. A construção da árvore NJ com replicação bootstrap foi feita pelo software Mega 5.

IV - DISCUSSÃO

O gênero *Begomovirus* é considerado um dos gêneros de maior importância econômica por causar doenças em diversas culturas de grande valor agrônomo gerando sérios prejuízos a agricultura mundial (Brown, 1992; Polston *et al.*, 1994; Moriones & Navas-Castilho, 2000). Várias tentativas vêm sendo realizadas para controlar as perdas que ocorrem na agricultura devido à infecção por begomovírus. No entanto, os eventos de recombinação gênica têm gerado grande diversidade desses vírus aumentando a complexidade de seu controle. Esse cenário tem estimulado pesquisas para novas medidas de controle que vão além do melhoramento genético tradicional, controles químicos e práticas culturais. Dentre as medidas de controle adotadas, a mais promissora é o desenvolvimento de culturas resistentes ou tolerantes à infecção por begomovírus através da engenharia genética (Freitas-Astúa *et al.*, 2002). O receptor transmembrana NIK1 regula uma via de sinalização em plantas relacionada à defesa antiviral através da autofosforilação reversível de resíduos de treonina presentes no seu domínio cinase (Santos *et al.*, 2009). Nesse trabalho foi caracterizado *in vivo* um mutante de NIK, cuja treonina 474 presente no seu domínio cinase foi substituída por um resíduo de ácido aspártico (um fosfomimético). Anteriormente, foi verificado que esta substituição de aminoácidos no domínio cinase de NIK1 provoca um aumento da sua atividade de cinase e que este mutante é capaz de suprimir a inibição que NSP de begomovírus provoca quando interage com NIK (Santos *et al.*, 2009). Dessa forma, o mutante superativo de NIK foi explorado como uma alternativa para se desenvolver uma planta geneticamente modificada resistente ou mais tolerante a infecção por begomovírus.

Os resultados obtidos mostraram que plantas de *Arabidopsis* superexpressando NIK1-T474D acumulam estavelmente a proteína transgênica, mas apresentam um fenótipo de desenvolvimento mais lento em comparação com as demais linhagens avaliadas. Além disso, uma queda na síntese proteica global foi também associada à expressão ectópica de NIK superativa. Essa diminuição na síntese de proteínas nas plantas mutantes T474D pode ser responsável pelo impacto no crescimento normal da planta. Outra possibilidade que colaboraria

para o desenvolvimento mais lento dessas plantas seria o fato delas apresentarem uma drástica indução de genes relacionados à defesa. De fato, a ativação constitutiva de genes que codificam proteínas R, apesar de promoverem um aumento de resistência em *Arabidopsis* (Ward *et al.*, 1991), causam efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento da planta (Zhang *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009). A diminuição geral na síntese de proteínas associada à expressão ectópica de NIK1 superativa pode constituir um mecanismo de defesa da planta contra a infecção por geminivírus. Por se tratar de vírus de genoma de DNA, a diminuição da tradução global do hospedeiro pode causar um forte impacto na síntese de novas proteínas virais já que esses dependem totalmente da maquinaria de tradução do hospedeiro para a síntese de proteínas virais (Nagar *et al.*, 1995).

Mecanismos de defesa em plantas contra ataque de patógenos envolvem várias vias de sinalização. A resposta de defesa gerada pela indução de uma dessas vias pode ser específica para um patógeno em particular, como é o caso da resistência mediada por gene-(R), ou pode ser geral atingindo vários patógenos. A resistência adquirida sistêmica (SAR) se enquadra nessa última categoria e constitui um dos mecanismos mais bem descritos da resposta imune em plantas (Ryals *et al.*, 1996). O ácido salicílico (SA) tem sido apontado como uma molécula sinalizadora essencial para indução da SAR. Durante a elevação dos níveis de SA nas células, o aumento da expressão de um grupo de genes relacionados à patogênese (PR) também tem sido associado ao início da SAR (Gaffney *et al.*, 1993). Isso significa que a SAR é o resultado da expressão conjunta de genes PR tendo, por isso, um amplo espectro de resistência a bactérias, fungos e vírus (Ryals *et al.*, 1996). Como a expressão ectópica de NIK1-T474D em *Arabidopsis* foi associada à indução de genes PR e a ativação de respostas de resistência mediadas por proteínas R (produção *in situ* de H₂O₂ e morte celular) provavelmente, a via de sinalização mediada por NIK está interligada a vias de sinalização responsáveis pela ativação do sistema imune de plantas. Bowling *et al.* (1994) reportaram que linhagens mutantes de *Arabidopsis* que expressam constitutivamente a resistência adquirida mediada por ácido salicílico foram menos suscetíveis a infecção por CaLCuV indicando que a ativação constitutiva da via do ácido salicílico prejudica a infecção por geminivírus. Posteriormente, os mecanismos pelos quais NIK promove a indução

de genes relacionados à via do ácido salicílico devem ser elucidados. Além disso, como a síntese de proteínas PR, como glucanases e quitinases, promove uma ampla resistência englobando bactérias, fungos e vírus, deve-se verificar se expressão ectópica de NIK1-T474D oferece resistência ou tolerância a outros patógenos além dos vírus.

Os ensaios de infectividade realizados apontaram para o surgimento de uma nova estratégia para se controlar a infecção por begomovírus, pois a expressão ectópica de NIK1-T474D em *Arabidopsis* aumentou a tolerância das plantas à infecção por begomovírus. A melhor performance dessa linhagem frente a infecção comprova que o receptor NIK superativo é capaz de gerar uma resposta de defesa antiviral constitutiva mediada por NIK. A ativação constitutiva desse receptor, bem como sua habilidade de superar o efeito inibidor de NSP, provavelmente são os fatores responsáveis pela maior tolerância à infecção exibida pela planta mutante T474D. De fato, NIK-T474D apresenta uma atividade de autofosforilação 1,5 vezes maior do que seu precursor NIK, consegue também suprimir a inibição causada por NSP quando este se liga ao seu domínio cinase e possui uma capacidade maior de realocar a proteína ribossomal L10A para o núcleo das células (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009).

Paralelamente aos experimentos realizados com *Arabidopsis* superexpressando NIK1-T474D, plantas de tomates expressando NIK1 superativa também foram estudadas (Brustolini *et al.*, 2012). As linhas transgênicas de tomate superexpressando NIK1-T474D também são tolerantes a infecção por begomovírus como ToYSV (*Tomato yellow spot vírus*) e ToSRV (*Tomato severe rugose virus*), que são vírus filogeneticamente distantes (Albuquerque *et al.*, 2012). Essas observações indicam o potencial da via de sinalização constitutiva mediada por NIK em conferir tolerância a vários tipos de begomovírus em diferentes plantas.

A análise do transcriptoma feita nas plantas de tomate T474D indicou que a resposta mediada por NIK e a resposta desencadeada pela infecção por geminivírus compartilham um mecanismo semelhante, já que o transcriptoma induzido por infecção viral na linhagem selvagem WT é mais relacionado ao transcriptoma do mutante transgênico não submetido à infecção. Isso indica que a

infecção viral induz mudanças na expressão gênica geral do hospedeiro similares aquela observada em linhagens superexpressando NIK1-T474D. Brustolini *et al.* (2012) também reportaram que a superexpressão do mutante NIK1-T474D em tomates provoca uma regulação negativa geral na expressão gênica. Similarmente, Havelda *et al.* (2008) relataram que uma das alterações induzidas por infecção viral na expressão gênica do hospedeiro é a drástica regulação negativa de genes. Foi demonstrado que a regulação negativa na expressão gênica em linhagens de tomates T474D abrange genes relacionados à maquinaria de tradução incluindo genes ribossomais, chaperonas moleculares e fatores de iniciação e alongação prejudicando assim, a síntese protéica. Dessa forma, a ativação constitutiva de NIK promove uma regulação negativa geral na tradução (Brustolini *et al.*, 2012).

Diferentemente de *Arabidopsis*, a inibição da tradução não prejudicou o desenvolvimento dos tomates transgênicos que também apresentaram uma indução da expressão de genes relacionados ao sistema imune de plantas. No entanto, essa indução não foi tão pronunciada quanto à observada em linhagens mutantes de *Arabidopsis*. Dessa forma, como a ativação constitutiva de proteínas R causa efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento de plantas, particularmente em *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009), é provável que o fator que mais contribui para o crescimento lento das linhagens T474D seja o grande acúmulo de proteínas R e não a diminuição da tradução protéica.

Os dados apresentados dão suporte para a criação de uma nova estratégia para controlar a infecção por begomovírus. A expressão ectópica de NIK1-T474D em linhagens de *Arabidopsis* e tomates se mostrou efetiva em controlar a infecção viral resultando em plantas mais tolerantes a begomovírus. A existência do receptor NIK em várias espécies de plantas economicamente importantes e o fato da interação NIK-NSP ser conservada entre diferentes espécies de begomovírus abre margem para se desenvolver outras plantas transgênicas superexpressando NIK1-T474D. Isso pode ter um grande impacto em controlar doenças provocadas por begomovírus em todo mundo. No entanto, o efeito provocado pela indução de genes que codificam proteínas R associada à expressão ectópica da NIK mutante no desenvolvimento das plantas deve ser avaliado durante a tentativa de se

transferir esse mecanismo de defesa para outras plantas de importância econômica.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, LC. Varsani, A. Fernandes, FR. Pinheiro, B. Martin, DP. de Tarso, OFP. Lemos, TO. Inoue-Nagata, AK.** 2012. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* **157**, 747-752.
- Aragão, FJ. & Faria, JC.** 2009. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature Biotechnology* **27**, 1086–1088.
- Ascencio-Ibanez, JT. Sozzani, R. Lee, T. Shu, TM. Russell, DW. Cella, R. Hanley-Bowdoin, L.** 2008. Global analysis of arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol* **148**: 436–454.
- Bechtold, N. Ellis, J. Pelletier, G.** 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *A. thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* **316**, 1194-1199.
- Berger, PH. Adams, MJ. Barnett, OW. Brunt, AA. Vetten, HJ.** Family *Potiviridae*. In: Fauquet, CM. Mayo, MA. Ball, LA. 2005. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego: Elsevier Academic Press. 819-841.
- Boulton, M.I.** 2003. Geminiviruses: major threats to world agriculture. *Annual Applied Biology* **142**, 143.
- Bowling, SA. Guo, A. Cao, H. Gordon, S. Klessing, DF. Dong, X.** 1994. A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.
- Brown, JK. Coats, S. Frohlich, DR. Belford, ID. Markhan, PG.** 1995. Characterization and distribution of esterase eletromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochemistry and Genetics* **33**, 205-214.

- Brustolini, OJB. Lopes, KVG. Condori-Apfata, JA. Coco, D. Zorzatto, C. Salvador, AC. Machado, JPB. Reis, PAB. Carvalho, HH. Alfenas-Zerbini, P. Zerbini, FM. Inoue-Nagata, AK. Chory, J. Ramos, HJ. Santos, AA. Fontes, EPB.** 2012. Constitutive activation of the receptor-like kinase NIK impairs translation and confers broad-spectrum tolerance to begomovirus infection. *PLoS Pathogen*. Submetido e em correção.
- Carvalho, CM. Santos, AA. Pires, SR. Rocha, SR. Saraiva, DI. Machado, JPB. Mattos, EC. Fietto, LG. Fontes, EPB.** 2008. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against viruses. *PLoS Pathogen* **4**, e1000247.
- Castillo-Urquiza, G. Beserra Junior, JEA. Alfenas-Zerbini, P. Barros, DR. Zerbini, FM.**2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch. Virol* **153**: 1985–1989.
- Chen, H. Zhang, Z. Teng, K. Lai, J. Zhang, Y. Huang, Y. Li, Y. Liang, L.** 2010. Up-regulation of LSB1/GDU3 affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway. *Plant Journal* **62**, 12–23.
- Covey, SN. Al-Kaff, NS.** 2000. Plant DNA viruses and gene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**, 307–322.
- Dellaporta, SL. Wood, J. Hicks, JB.** 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19–21.
- Fontes, EPB. Santos, AA. Luz, DF. Waclawovsky, AJ. Chory, J.** 2004. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes & Development* **18**, 2545-2556.
- Freitas-Astuá, F. Purcifull, DE. Polston, JE. Hiebert, E.** 2002. Traditional and transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 437-445.

- Gaffney, T. Friedrich, L. Vernooij, B. Negrotto, D. Nye, G. Uknes, S. Ward, E. Kessmann, H. Ryals, J.** Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. 1993. *Science* **261**, 754-756.
- Gao, M. Wang, X. Wang, D. Xu, F. Ding, X. Zhang, Z. Bi, D. Cheng, Y.** 2009. Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell host Microbe* **6**:34-44.
- Gonsalves, D.** 1998. Control of Papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review Phytopathology* **36**, 415–437.
- Gutierrez, C.** 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminivirus. *The EMBO Journal* **19**, 792-799.
- Havelda, Z. Varallyay, E. Valoczi, A. Burgyan, J.** 2008. Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant Journal* **55**, 278–288.
- Horiguchi, G. Van Lijsebettens, M. Candela, H. Micol, JL. Tsukaya, H.** 2012. Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant Science* **191**, 24-34.
- Hou, YM. Sanders, R. Ursin, VM. Gilbertson, RL.** 2000. Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **13**, 297–308.
- Ilyas M. Qazi J. Mansoor S. Briddon RW.** 2010. Genetic diversity and phylogeography of begomoviruses infecting legumes in pakistan. *Journal Genetic Virology* **22**, 124-453.
- Jeske, H. Lutgemeier, M. Preiss, M.** 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal* **20**, 6158-6167.

- Langmead, B. Pop, M. Salzberg, SL.** 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25.
- Lichthenthaler, HK.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego 350-382.
- Mansoor, S. Briddon, RW. Zafar, Y. Stanley, J.** 2003. Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Science*. **8**, 128–134.
- Mariano AC, Andrade MO, Santos AA, Carolino SMB, Oliveira ML, Baracat-Pereira MC, Brommonshenkel SH, Fontes EPB.** 2004. Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology* **318**, 24-31.
- Moffat, AS.** 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* **286**, 1835.
- Morales, FJ. Anderson, PK.** 2001. Emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America. *Archives of Virology* **146**, 415-441.
- Moriones, E. and Navas-Castillo, J.** 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* **71**, 123–134.
- Murashige, T. Skoog, F.A.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nagar, S. Pedersen, TJ. Carrick, KM. Hanley-Bowdoin, L. Robertson, AA.** 1995. Geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cell. *Plant Cell* **7**, 705-719.
- Nolen, B. Taylor, S. Ghosh, G.** 2004. Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation. *Molecular Cell* **15**, 661–675.
- Pieterse, CMJ. Van Loon, LC.** 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 456-464.

- Polston, JE. Bois, C. Serra, CA. Cocepcion, S.** 1994 First report of tomato yellow leaf curl – like geminivirus from tomato in the western hemisphere. *Plant Disease* **78**, 831-834.
- Powell-Abel, P. Nelson, RS. De, B. Hoffman, N. Rogers, SG. Fraley, RT. Beachy, RN.** 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738–743.
- Rao, M.V. Paliyath, G. Ormrod, DP. Murr, DP. Watkins, CB.** 1997. Influence of nsalicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂ - metabolizing enzymes. *Plant Physiology* **115**, 137-149.
- Ribeiro, SG. Ambrozevicius, LP. Ávila, AC. Bezerra, IC. Rocha, H. Zerbini, FM.** 2003. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Archives of Virology* **148**, 281-295.
- Robinson, MD. McCarthy, DJ. Smyth, GK.** 2010. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140.
- Robinson, MD. Oshlack, A.** 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* **11**, 25.
- Rojas, M.R. Gilbertson, R.L. Russel, D.R. Maxwell, DP.** 1993. Use of degenerate oligonucleotídeos in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* **77**, 340–347.
- Rojas, MR. Hagen, O. Lucas, WJ. Gilbertson, RL.** 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergente of geminiviruses. *Annual review of phytopathology* **43**, 361-394.
- Ryals, JA. Jeuenschwander, UH. Willits, MG. Molina, A. Steiner, HY. Hunt, MD.** 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- Sambrook, J. Fritsch, E F. Maniats, T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor.

- Santos, AA. Carvalho, CM. Florentino, LH. Ramos, JJO. Fontes, EPB.** 2009. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE* **4**, e5781.
- Schaffer, RL. Miller, CG. Petty, ITD.** 1995. Virus And Hostspecific adaptations in the BL1 and BR1 genes of bipartite geminiviruses. *Virology*, **214**, 330–338.
- Shah, K. Vervoort, J. de Vries, SC.** 2001. Role of threonines in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 41263-41269.
- Shepherd, DN. Mangwende, T. Martin, DP. Bezuidenhout, M. Kloppers, FJ. Carolissen, CH. Monjane, AL. Rybicki, EP. Thomson, JA.** 2007. Maize streak virus-resistant transgenic maize: a first for Africa. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 759–767.
- Shepherd, DN. Martin, DP. Thompson, JA.** 2009. Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Plant Science* **176**, 1-11.
- Schippers, JHM. Mueller-Roeber, B.** 2010. Ribosomal composition and control of leaf development, *Plant Science* **179**, 307–315.
- Silva, SC. Assunção, IP. Carnauba, JP. Lima, JS. Amorim, E. Lima, GA.** 2006. Begomovirus detection in passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims) in the State of Alagoas, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* **28**, 13-15.
- Stanley, J. Bisaro, DM. Briddon, RW. Brow, JK. Fauquet, CM. Harrinson, BD. Rybick, EP.** 2005. *Geminiviridae*. p.301-326 in: virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses, eds. Elsevier/academic press, london.
- Timmersmans, MCP. Das, OP. Messing, J.** 1994. Geminiviruses and their uses as extrachromosomal Replicons. *Plant Molecular Biology* **45**, 79-112.

- Vanderschuren, H. Stupak, M. Fütterer, J. Wilhelm Gruissem, W. Zhang, P.** 2007. Engineering resistance to geminiviruses – review and perspectives. *Plant Biotechnology Journal* **5**. 207-220.
- Vanitharani, R. Chellappan, P. Fauquet, CM.** 2005. Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Science* **10**. 144-151.
- Ward JH .** 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Amer Stat Assoc* **48**, 236–244.
- Weigel, D. Glazebrook, J.** 2002. *Arabidopsis: A laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York. 85-87.
- Zhang, Y. Goritschnig, S. Dong, X. Li, X.** 2003. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell* **15**, 2636–2646.
- Zhou, A. Wang, H. Walker, J.C. Li, J.** 2004. BRI1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Journal* **40**, 399-409.

VI - ANEXOS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos usados em amplificações de mutagênese sítio dirigida

- Gene At5g16000 - NIK1

Oligonucleotídeo	Mutação	Sequência
NIK1T1420D Fwd NIK1T1420D Rvs	474 Tre→Asp	5'-TGACAACCGCGGTTAGAGGCGAGGTGGGTACAT-3' 5'-GCCTCTAACCGCGGTTGTCACATGAGAATC-3'
NIK1T1420DSalGV Fwd NIK1T1420DSalGV Rvs	473 Gli→Val e 474 Tre→Ala	5'-TGTGACAACCGCGGTTAGAGtCgacGTGGGTAC-3' 5'-CTCTAACCGCGGTTGTCACATGAGAATCTT-3'

*Bases mutadas estão destacadas ou em letras minúsculas.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos usados para clonagens e confirmações gênicas

Oligonucleotídeo	Sequência	Região de anelamento
DON Fwd	5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC-3'	Vetor DON 201
DON Rvs	5'-TGTAACATCAGAGATTTGAGACAC-3'	Vetor pDON 201
MC36	5'-TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC-3'	Promotor 35S
AttB1 Fwd	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'	Complemento da região de recombinação
AttB2 Rvs	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'	Complemento da região de recombinação
566CLCVBFBR1v	5'-GGCGTGGGGTATCTTACTC-3'	Amplifica gene NSP de CaLCuV
1253CLCVRBR1c	5'-GACATAGCATCGGACATCC-3'	Amplifica gene NSP de CaLCuV
AtACTIN Fwd	5'-ATGTCGTGAGCCATCCTGTC-3'	Anela na sequência do mRNA da actina
AtACTIN Rvs	5'-ACACCGGATTCGTGCGGCAT-3'	Anela na sequência do mRNA da actina
ATNIK Fwd	5'-AAAAAGCAGGCTTACAATGGGAGCTGCAAGAGGG-3'	Anela na sequência do mRNA de NIK1
ATNIK Rvs	5'-GAAAGCTGGGTCTCATCTAGGACCAGAGAGCTC-3'	Anela na sequência do mRNA de NIK1

Tabela 3 - Identidade dos genes relacionados à defesa avaliados por qRT-PCR e sequências dos oligonucleotídeos

Gene	Sequência dos oligonucleotídeos
At5g179701 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	TGTCTCTAGGCGAAACTGCGATA Fwd CGCCATCTCCAATGAGACAA Rvs
At5g401001 Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	CCACATAGTGCTCGCTTCCA Fwd TTGGGTAGGCGACTCTTTCTG Rvs
At3g58600.1 Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 NECAP-1	GTTCCAAGTGCCTGAATGCTATG Fwd CGTCCCACACTCATCTGCTCTGT Rvs
At1g33560.1 NBS-LRR disease resistance protein	GACATCACGACGCAACTCTTAAA Fwd AGTCGTTCCGGCGATTCCTTT Rvs
At5g400201 Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein	CCTCCGGCAACACTTATCAA Fwd CCGTCCACGAGGCTTACATC Rvs
At1g552301 Family of unknown function	CTCGTTGCATCTTCTGCCTTT Fwd TGTCCTCAATGCCCATGT Rvs
At3g232401 member of the ERF (ethylene response factor) subfamily	TTGATCACCGCTCCGTGAA Fwd CCCCAAAAGCTCCTCAAGGT Rvs
At2g477101 Adenine nucleotide hydrolases-like superfamily protein	GGTGATGGTCGTCGGAGTTG Fwd AAGGAGCGAAGAAACGATCGA Rvs
At1g519101 Leucine-rich repeat protein kinase family protein	TGGCTGGTGTGATCGCATTAA Fwd AGCTTCACCACTTCCCTGTTTTT Rvs
At4g337201 CAP (Cysteine-rich secretory proteins, Antigen 5, and Pathogenesis-related 1 protein)	AGCGGGTCCTATGGAGAGAAC Fwd TCGTCCACCCACATGTCAAC Rvs
At1g732601 trypsin inhibitor involved in modulating programmed cell death in plant-pathogen interactions	AACGCATATGGTGCGGTTGT Fwd CCACGGATGACAGGGAGAAC Rvs
At4g116501 Osmotin-like protein, Thaumatin, pathogenesis-related, PR-5	TTCCGCACTTTTGCTCATCTC Fwd TTCCGCACTTTTGCTCATCTC Rvs
At3g14460 Arabidopsis thaliana disease resistance protein (NBS-LRR class)	CCAAAAAGCATTGCCGAACT Fwd ATCCGGGTGGCATCTCTACT Rvs
At1g56520 Arabidopsis thaliana disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	TGATGTCCGCAACCAAACC Fwd GGTCAAAGCTTGGGTCCATTT Rvs

5 - CAPÍTULO III

ATIVIDADE DE FOSFORILAÇÃO DE NIK1 (NSP-INTERACTING KINASE)

RESUMO

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Atividade de fosforilação de NIK1 (NSP-Interacting Kinase)**. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Sebastião Tavares Rezende.

O receptor NIK de *Arabidopsis thaliana* é um receptor transmembrana do tipo serina/treonina cinase que pertence à sub-família LRR-II-RLK. As proteínas NIK foram inicialmente identificadas pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivírus relacionada ao movimento do DNA viral na célula vegetal. A inibição da autofosforilação de NIK por NSP e a inativação de genes *NIKs* aumenta a suscetibilidade à infecção viral, sugerindo que esta proteína estaria envolvida em uma via de defesa contra a infecção por geminivírus. A proteína ribossomal L10A foi identificada como um componente “downstream” na via de sinalização mediada por NIK. Pela atuação de NIK, a proteína L10A é translocada do citoplasma para o núcleo das células, onde ela, possivelmente, irá atuar na ativação ou repressão de genes envolvidos na via de defesa em resposta à infecção por geminivírus. Além disso, a proteína NSP, ao inibir a autofosforilação de NIK, interfere na realocação de L10A para o núcleo das células resultando num aumento da susceptibilidade das plantas ao ataque de geminivírus. No presente estudo, procurou-se caracterizar enzimaticamente a capacidade da proteína NIK de fosforilar o substrato endógeno L10A. Os resultados obtidos indicaram que L10A não é um substrato direto de NIK1 *in vitro*, mas sim, um possível inibidor da atividade da enzima. Sendo assim, esse receptor deve utilizar uma proteína intermediária para direcionar a fosforilação de rpL10 *in vivo*. O resíduo de treonina presente na posição 474 na alça de ativação do domínio cinase de NIK é essencial para ativação da cinase. Nesse trabalho, um peptídeo sintético contendo uma sequência de resíduos de aminoácidos da alça de ativação de NIK que sobrepõe a posição da treonina 474 mostrou ser um substrato de NIK. Esse peptídeo foi fosforilado por NIK e a incorporação do fosfato foi demonstrada por espectrometria de massa. Além disso, o espectro gerado evidenciou um novo sítio de fosforilação da NIK correspondente à tirosina na posição 482 do peptídeo.

Futuramente, experimentos deverão ser conduzidos para avaliar a importância biológica deste sítio de fosforilação adicional presente na alça de ativação de NIK.

ABSTRACT

LOPES, Kênia Viçoso Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012.
Phosphorylation activity of NIK (NSP-Interacting Kinase). Adviser:
Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and
Sebastião Tavares Rezende.

The NIK receptor of *Arabidopsis thaliana* is a transmembrane receptor from serine/threonine kinase type that be part of LRR-RLK subfamily. NIK was first identified by its capacity to interact with the geminivirus NSP protein related to the viral DNA movement in the plant cell. The autophosphorylation inhibition of NIK for NSP and the inactivation of *NIKs* genes increase the susceptibility to viral infection, suggesting that this protein was involved in a defence pathway against geminivirus infection. The ribosomal protein L10A was identified as a downstream component of this signaling pathway, mediated by NIK. By the action of NIK, L10A is translocated from the cytoplasm to the nucleus of cells where it possibly will acting in the activation or repression of genes involved in defense pathway in response to infection by geminiviruses. Furthermore, the NSP protein, by inhibiting the autophosphorylation of NIK, interferes in the reallocation of L10A to the cell nucleus resulting a increasing in the plants susceptibility to geminivirus attack. In this study, tried to enzymatically characterize the ability of the protein NIK to phosphorylate the endogenous substrate L10A. The results indicated that L10A is not a direct substrate of NIK1 *in vitro*, but, a possible inhibitor of the enzymatic activity. Thus, this receptor should use an intermediary protein to direct the phosphorylation of rpL10 *in vivo*. The threonine residue at 474 position in the activation loop of kinase protein is crucial for activation of kinase. In this study, a synthetic peptide containing a sequence of amino acids residues of the activation loop of NIK which overlaps the position of the 474 threonine to be a NIK substrate. This peptide was phosphorylated *in vitro* by NIK and the phosphates incorporation was demonstrated by mass spectrometry. Moreover, the spectrum showed a new phosphorylation site of corresponding enzyme to the tyrosine at 482 position of the peptide. In the future, experiments

should be conducted to assess the biological importance of this additional site of phosphorylation present in the activation loop of NIK.

I - INTRODUÇÃO

Proteínas cinases (protein kinase - PK) formam um grupo de enzimas dotadas de um domínio catalítico que catalisa a transferência do grupo γ -fosfato do ATP para um ou mais resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica de uma proteína-substrato. Essa reação gera mudanças conformacionais afetando a função da proteína alvo (Lin *et al.*, 1992). NIK é um receptor inserido na membrana plasmática de células de plantas, cujo domínio intracelular exibe atividade de serina/treonina cinase. As proteínas NIKs (NSP-Interacting Kinase) foram identificadas primeiramente pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivírus que facilita o movimento intracelular do DNA viral na célula vegetal. NSP atua inibindo as atividades de autofosforilação e de fosforilação de NIK e, portanto, interfere nas vias de resposta de defesa a vírus mediadas por NIK (Fontes *et al.*, 2004).

Receptores cinases desempenham funções essenciais na percepção e transdução de sinais que possibilitam os organismos interagirem com seu ambiente e modular seu metabolismo para se adaptar às adversidades (Gorin & Rothstein, 1992; Goring & Walker, 2004). O evento que desencadeia uma resposta de defesa inicia-se pela percepção de um estímulo primário pelo domínio extracelular de um receptor. Posteriormente, ocorre a transmissão de sinais secundários a partir da membrana plasmática. A acumulação de moléculas sinalizadoras no interior da célula causa a indução de cascatas específicas de fosforilações e desfosforilações. As mudanças metabólicas desencadeadas por esses eventos incluem a ativação de genes envolvidos em respostas de defesa particulares e alterações em processos de desenvolvimento (Gachomo *et al.*, 2003).

Os receptores celulares podem ser divididos, primeiramente, em duas categorias gerais de acordo com as diferentes especificidades exibidas por seus domínios cinases. São elas: receptores tirosina-cinase (RTKs) que fosforilam resíduos de tirosina em seus substratos-alvo e são mais comuns em células animais e receptores serina/treonina-cinase (RSTKs) que atuam fosforilando

resíduos de serina e/ou treonina em seus substratos-alvos, sendo mais comuns em células vegetais (Braun *et al.*, 1996; Becraft, 1998).

O genoma de plantas codifica um grande número de proteínas com topologias preditas de receptores cinases. Tais proteínas são referidas como RLKs (Receptors Like Kinase - Becraft, 1998). Os RLKs são receptores transmembrana que possuem uma organização estrutural conservada formada basicamente por uma porção amino-terminal extracelular, uma região hidrofóbica transmembrana seguida por um sítio de ligação a nucleotídeo (NBS) e por um domínio carbóxi-terminal citoplasmático. Através da porção extracelular do receptor ocorrem interações proteína-proteína e o reconhecimento de moléculas ligantes. O domínio intracelular possui atividade de serina/treonina cinase relacionada a transdução de sinais (Morillo & Tax., 2006).

O modelo atual de ação dos receptores cinases preconiza que RLKs percebem o estímulo através do seu domínio extracelular e propagam esse sinal até o domínio cinase intracelular (Shiu & Bleecker 2001). Esses receptores estão presentes na membrana na forma de monômeros inativos. A ligação de uma molécula ligante específica induz uma mudança conformacional no domínio extracelular do RLK, o que acarreta a oligomerização de dois monômeros. A formação de dímeros de RLKs aproxima os domínios cinases que sofrem transfosforilação e subsequente ativação (Becraft, 1998; Nam & Li, 2002; Tör *et al.*, 2009).

Os RLKs de plantas podem ser classificados em duas categorias gerais de acordo com a função em que estão relacionados (Shiu *et al.*, 2004). A primeira categoria funcional consiste em cinases envolvidas em processos de crescimento celular e desenvolvimento (Clark *et al.*, 1997; Li & Chory, 1997; Jinn *et al.*, 2000; Hecht *et al.*, 2001). A segunda categoria inclui RLKs envolvidas em interação planta-patógeno e em respostas de defesa da planta (Song *et al.*, 1995; Gomez-Gomez & Boller, 2002; Fontes *et al.*, 2004).

NIK1 (At5g16000), NIK2 (At3g25560) e NIK3 (At1g60800) são receptores transmembranas do tipo serina/treonina cinase de *Arabidopsis* que estão inseridos no grupo formado por proteínas de defesa (Zhang *et al.*, 2006).

Conforme mencionado anteriormente, as proteínas NIKs foram identificadas primeiramente pela sua capacidade de interagir com a proteína NSP de geminivírus que inibe sua atividade de cinase (Fontes *et al.*, 2004). Devido ao aumento da suscetibilidade de plantas nocautes de NIK à infecção por geminivírus, NIK foi classificado com sendo um receptor do sistema imune da planta que propaga um sinal de defesa contra vírus (revisado em Santos *et al.*, 2010).

Visando elucidar componentes da via de sinalização antiviral mediada por NIK foi identificada, por ensaios de duplo híbrido, a proteína rpL10A como um possível substrato que interage com NIK (Rocha *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2008). A proteína rpL10A é um componente da subunidade maior dos ribossomos que é codificada por uma pequena família de genes representada por 3 cópias no genoma de *A. thaliana*: rpL10A, rpL10AB e rpL10AC (Barakat *et al.*, 2001).

Homólogos dessa proteína têm sido encontrados nos ribossomos de plantas, animais, bactérias e fungos (Marty *et al.*, 1993; Wiens *et al.*, 1999; Hofer *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2005). As proteínas L10, identificadas até então, possuem propriedades básicas, hidrofílicas, com peso molecular na faixa de 24 a 25 kDa. As seqüências protéicas, altamente conservadas, evidenciam funções críticas desempenhadas pelas L10 nos organismos (Zhao *et al.*, 2005).

Esta proteína está envolvida em vários processos celulares. Primeiramente, a incorporação de L10 na subunidade maior é um evento fundamental para o processo de montagem ribossomal. Mutações em L10 de leveduras evidenciaram que essa proteína é essencial para junção da subunidade ribossomal maior com a menor permitindo, assim, o início da tradução (Eisinger *et al.*, 1997). Estudos com leveduras também demonstraram que a incorporação de L10 é um passo crucial para a exportação nuclear da subunidade maior, já que causa a dissociação e reciclagem do adaptador exportina Nmd3p, que provê o sinal de exportação nuclear da subunidade ribossomal maior para o citoplasma (Hedges *et al.*, 2005).

Em células eucarióticas, há evidências de que L10 desempenha outras funções ditas “extrarribosomais” (Wool, 1996). Sua função mais conhecida é a de atuar como supressora de tumores em células tumorais de Wilms em humanos

(Dowdy *et al.*, 1991). Além disso, L10 interage com a proteína cinase c-Yes relacionada a processos celulares como divisão, migração, diferenciação e estabilidade (Oh *et al.*, 2002) e com o fator Presenilina1 relacionada a doença de Alzheimer (Imafuku *et al.*, 1999).

A proteína rpL10A atua como componente “downstream” na via de sinalização mediada por NIK. A interação entre L10A e NIK promove o deslocamento da proteína L10A do citoplasma para o núcleo das células, onde ela, possivelmente, irá atuar na ativação ou repressão de genes envolvidos na via de defesa em resposta à infecção por geminivírus (Carvalho *et al.*, 2008). Foi demonstrado também que NSP, ao inibir a autofosforilação de NIK (Fontes *et al.*, 2004), interfere na realocação de L10A para o núcleo das células resultando num aumento da susceptibilidade das plantas ao ataque de geminivírus (Carvalho *et al.*, 2008).

Corroborando a afirmação de que NIK e L10A participam da mesma via de defesa em plantas, verificou-se que plantas nocautes *rpl10a* e *nik1* infectadas com geminivírus exibem um aumento de susceptibilidade à infecção viral quando comparadas com a linhagem Col-0 infectada. Ou seja, as duas linhagens caracterizadas pela perda de função dos genes *L10A* e *NIK* apresentam o mesmo fenótipo de susceptibilidade quando são infectadas por geminivírus. Além disso, a infecção por geminivírus em folhas de tabaco expressando transientemente L10A fusionada a proteína fluorescente YFP (*yellow fluorescent protein*) causou o acúmulo de L10 no citoplasma das células na forma de corpúsculos dispersos. Essa mudança induzida na localização subcelular de L10 parece ser devido à supressão da atividade de cinase de NIK1 pela proteína viral NSP (Carvalho *et al.*, 2008).

Com o intuito de se caracterizar enzimaticamente a atividade de NIK em relação ao seu possível substrato endógeno L10A, o principal objetivo deste trabalho foi determinar os parâmetros cinéticos da reação enzimática utilizando o domínio cinase de NIK1 e a proteína L10A. Além disso, a fosforilação de um peptídeo da alça de ativação de NIK foi conduzida para confirmar os sítios de fosforilação em NIK.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Construções de cDNA e transformação

Os cDNAs de rpL10A e do domínio cinase de NIK1 foram clonados por recombinação no vetor de entrada pDONR201 do sistema Gateway (Invitrogen Life Technologies, Inc) resultando nos plasmídeos recombinantes pDO-L10A (Rocha *et al.*, 2008) e pDO-KDNIK1 (Fontes *et al.*, 2004), respectivamente. A transferência dos referidos genes de pDONR201 para o vetor pDEST15 (Invitrogen) por meio da LR clonase (Invitrogen) deu origem aos clones pGST-L10 (pUFV730) e pGST-KDNIK1 (pUFV 630). A expressão nestes vetores permite a síntese das proteínas fusionadas a uma cauda de GST (*Glutathione S-transferase*) possibilitando a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

2 - Expressão heteróloga em *E. coli* e purificação de proteínas recombinantes

2.1 - Preparo das células competentes e de *E. coli* BL21:DE3 (pLYSs)

As colônias individuais de *E. coli* transformadas com o clone pGST-L10 (pUFV730) descritos acima e pGST-NIK1 previamente descrito (Fontes *et al.*, 2004) foram incubadas em 2 mL de meio LB contendo ampicilina 100 mg.L⁻¹ a 37°C e 180 rpm por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e, em seguida, foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* da estirpe BL21:DE3(pLYSs). As células competentes foram preparadas em CaCl₂ 0,1 M, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Cerca de 75 µL de células competentes foram transformadas, por choque térmico, com os plasmídeos de interesse, e selecionadas em meio suplementado com os antibióticos ampicilina 100 mg.L⁻¹ e cloranfenicol 35 mg.L⁻¹. Os transformantes foram confirmados via PCR, com oligonucleotídeos específicos para a seqüência do gene de interesse e para o vetor (GST senso – CCAATGTGCCTGGATGCGTTCC; L10A anti-senso -

AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAAGAAGACCTGT; KDNIK1 anti-senso - AAAAAGCAGGCTTCACAATGGGAGCTGCAAGAGGG;) e o produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

2.2 - Indução da expressão das proteínas fusionadas a pGST em *E. coli*

Os clones pGST-L10 (pUFV741) e pGST-KDNIK1 (pUFV648) em *E. coli* estirpe BL21:DE3 (pLYSs) foram crescidos em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina (100 mg.L⁻¹), até D.O. igual a 0,6, quando foram transferidos para 500 mL do mesmo meio. Ao atingirem a D.O. igual a 0,8, foram induzidos pela adição de 0,4 mM de isopropilil- β -D-thiogalactopiranosídeo (IPTG). Após incubação a 20°C e 200 rpm, por 16 horas, procedeu-se à purificação das proteínas.

2.3 - Purificação e quantificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes fusionadas à GST foram purificadas por cromatografia de afinidade com resina Glutathiona Sepharose 4B. Para purificação em grande escala, 500 mL de células induzidas foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH7,3). Após ressuspensão, foram adicionados 100 μ L dos inibidores de protease PMSF 100 mM, thiuréia 50 mM e benzamidina 50 mM. Em seguida, foi adicionado 100 μ g.mL⁻¹ de lisozima mantendo-se por 30 minutos no gelo. O rompimento das células ocorreu por ultrassonicação com os padrões de pulso 5, amplitude 60/80, por 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos para a remoção de restos celulares e obtenção do sobrenadante. O sobrenadante foi ligado à resina Glutathiona Sepharose 4B (Amersham) previamente equilibrada com o tampão de ligação e, após 4 horas sob agitação lenta, as proteínas aderidas à resina foram eluídas de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas foram então quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando, como padrão, a albumina soro bovina (BSA).

3 - Ensaio de atividade de cinase

A atividade de cinase de NIK foi avaliada usando o kit ADP questTM Assay (DiscoverRx, Fremont, CA) que detecta intensidade de fluorescência liberada em reações acopladas à formação do produto ADP. Sendo assim, o ensaio emprega um método para medir a quantidade de ADP que se forma como produto da atividade da enzima. O ADP é detectado usando uma reação acoplada à enzima que produz H₂O₂ a partir do ADP. O H₂O₂ é então convertido no composto fluorescente resorufina. A detecção da fluorescência foi realizada usando o comprimento de onda de excitação de 530 nm e de emissão de 590 nm.

Primeiramente, foi feita uma curva padrão de ADP para se converter, posteriormente, as leituras de fluorescência dos ensaios em concentração. Para construção dessa curva, soluções de diferentes concentrações de ADP foram obtidas diluindo a solução estoque de ADP (225 µM) em tampão de reação contendo HEPES 15mM, NaCL 20mM, EGTA 1mM, Tween 20 a 0,02% e MgCl₂ 10mM, pH 7,4. A faixa de concentração utilizada variou de 0 a 50 µM de ADP. Depois da obtenção das soluções nas concentrações estipuladas, foi adicionado o reagente de detecção fornecido pelo kit e, após 20 minutos, procedeu-se à leitura das fluorescências emitidas pelas amostras.

Também foi feita uma curva de tempo para se estipular o melhor intervalo de tempo para determinar a atividade da enzima. Nesse ensaio, as reações contendo 30 µM de ATP e 1,5 µM de NIK em tampão de reação foram realizadas à temperatura ambiente. Após o término do tempo de cada reação, que foram finalizadas a cada 30 minutos pela adição do reagente de detecção, as leituras de fluorescência foram medidas. Uma curva de tempo usando rpL10A como possível substrato direto de NIK1 também foi feita. Para esse ensaio foi utilizado 30 µM de L10A, 10 µM de ATP e 1,5 µM de enzima em tampão de reação. Após o término de tempo de cada reação, que foram finalizadas a cada 5 minutos pela adição do reagente de detecção, procedeu-se às leituras das amostras. Todas as reações foram feitas em microplacas pretas de 384 poços e as leituras das fluorescências foram detectadas em leitor de placa de Elisa. Reações-controle, sem NIK1, foram

incluídas em cada ensaio e o sinal emitido pela leitura desse controle foi usado para correção do “background”.

4 - Ensaio de fosforilação usando peptídeo sintético

Para o ensaio de fosforilação, 50 μM do peptídeo sintético P2 foi incubado com 1,5 μM da proteína KDNIK1 fusionada à GST em tampão de reação contendo HEPES 18 mM (pH 7,4), MgCl_2 10 mM, MnSO_4 10 mM, DTT 1mM e ATP 20 μM (Fontes *et al.*, 2004). Após 45 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1M de bicarbonato de amônio pH10,0. Em seguida, a reação foi submetida a uma coluna de dessalinização e a amostra foi avaliada por espectrometria de massa.

III - RESULTADOS E CONCLUSÕES

1 - Expressão em *E. coli* e purificação das proteínas L10 e KDNIK1 fusionadas a GST

Com o objetivo de verificar se a proteína L10A é um substrato direto de NIK1 foi realizado um ensaio de atividade de cinase utilizando a enzima NIK1 e seu possível substrato endógeno L10A. Para isso, primeiramente, as regiões correspondentes ao domínio cinase de NIK1, bem como o cDNA de *L10A* foram clonados no vetor de expressão em bactérias pDEST 15. Posteriormente, essas proteínas recombinantes fusionadas à GST foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) pLysS, purificadas por cromatografia e analisadas por SDS-PAGE (Fig. 1).

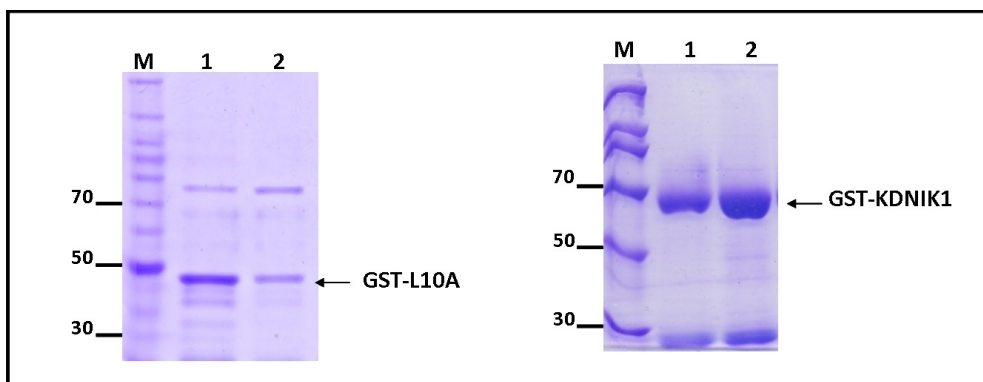


Figura 1. Purificação das proteínas recombinantes L10A e KDNIK1 fusionadas a GST. As proteínas purificadas foram reveladas por *Comassie Brilliant Blue*. As canaletas 1 e 2 correspondem, respectivamente, a proteína no 1º e 2º eluato. M corresponde ao marcador de massa molecular.

A coloração por *Comassie Brilliant Blue* evidenciou que a proteína GST-NIK1 foi purificada em alta homogeneidade apresentando uma massa molecular de, aproximadamente, 65 kDa. A proteína rpL10A purificada apresentou uma massa molecular de, aproximadamente, 47 kDa, sendo que o nível de homogeneidade das frações purificadas foi bem inferior ao da proteína GST-NIK1, com diversos contaminantes presentes.

2 - Curva padrão do ADP e curva do tempo

A proteína NIK1 de *Arabidopsis* é um membro da diversa família de receptores com atividade de serina/treonina cinase, cuja atividade de autofosforilação já foi demonstrada *in vitro* (Fontes *et al.*, 2004). Por meio de mutagênese em diversos resíduos de treonina na alça de ativação da cinase, acompanhado por ensaios de completção de função *in vivo*, foi demonstrado que o resíduo de treonina na posição 474 é essencial para ativação da cinase (Santos *et al.*, 2009) Além disso, fosforilação nesta posição 474 foi confirmada *in vitro* por meio de espectrometria de massa. Diversas evidências *in vivo* ligam rpL10 à via de sinalização antiviral mediada por NIK e sugerem que rpL10 possa ser o substrato de NIK. Estas incluem: (i) capacidade de rpL10 de interagir diretamente com NIK1 em leveduras (Carvalho *et al.*, 2008); (ii) interação de NIK1 com rpL10 *in vivo*, conforme demonstrado por ensaios de co-imunoprecipitação (Carvalho *et al.*, 2008), (iii) aumento na translocação de rpL10 para o núcleo dependente da fosforilação da proteína e da co-expressão transiente de NIK1 em folhas de tabaco (Carvalho *et al.*, 2008) e (iv) similar fenótipo de suscetibilidade à geminivírus de linhagens de *Arabidopsis* nocautes para rpL10 e NIK (Rocha *et al.*, 2008). Entretanto, a eficiência de fosforilação de rpL10 por NIK1 *in vitro* é muito baixa, havendo uma significativa predominância de autofosforilação da proteína receptora (Santos *et al.*, 2009). Estes resultados podem ser devido a uma das duas alternativas: rpL10 não seria de fato o substrato direto de NIK *in vivo* ou a autofosforilação da cinase ocorre com alta eficiência que previne, por competição, a fosforilação do substrato *in vitro* em ensaios de incorporação de fosfato radioativo nas proteínas cinases e substrato.

Com a finalidade de se confirmar a atividade de fosforilação do substrato de NIK1 *in vitro*, foi utilizado um ensaio bioquímico distinto que mede a concentração de ADP liberada na reação enzimática, ao invés de incorporação do fosfato na proteína. Durante o processo de detecção do ADP, este é convertido em H₂O₂ que é usado para gerar o composto fluorescente resorufina, cuja fluorescência é detectada e quantificada.

Inicialmente, foi construída uma curva padrão de ADP para se converter, posteriormente, a fluorescência gerada pela produção do ADP nos ensaios enzimáticos em concentração (Fig. 1a). A curva padrão obtida tem uma faixa de detecção de concentração de ADP que abrange 1 µM até 50 µM. Dessa forma, a concentração final da enzima nos ensaios posteriores foi estipulada em 1,5 µM, já que é um valor onde a autofosforilação de NIK1 irá produzir uma quantidade de ADP detectável pela curva padrão, ou seja, acima de 1 µM.

Numa reação enzimática, o tempo de incubação do substrato e enzima suficiente para se detectar a atividade varia muito, sendo particular para cada enzima. Dessa forma, para se determinar o tempo necessário para realizar os ensaios utilizando NIK1, foi feita uma curva de tempo em que se incubaram 30 µM de ATP com 1,5 µM do domínio cinase de NIK1 (KDNIK1) purificado em tampão de reação (Fig. 1b). A cada 30 minutos, durante 2,5 horas, as reações foram submetidas à leitura de fluorescência. Pelo gráfico, podemos verificar que a atividade de autofosforilação de NIK1 começa a subir muito a partir de 1 hora de reação. Dessa forma, foi estipulado o tempo de 1,5 hora de reação para os demais ensaios.

Equação:

$$y = 16322 + 2825x$$

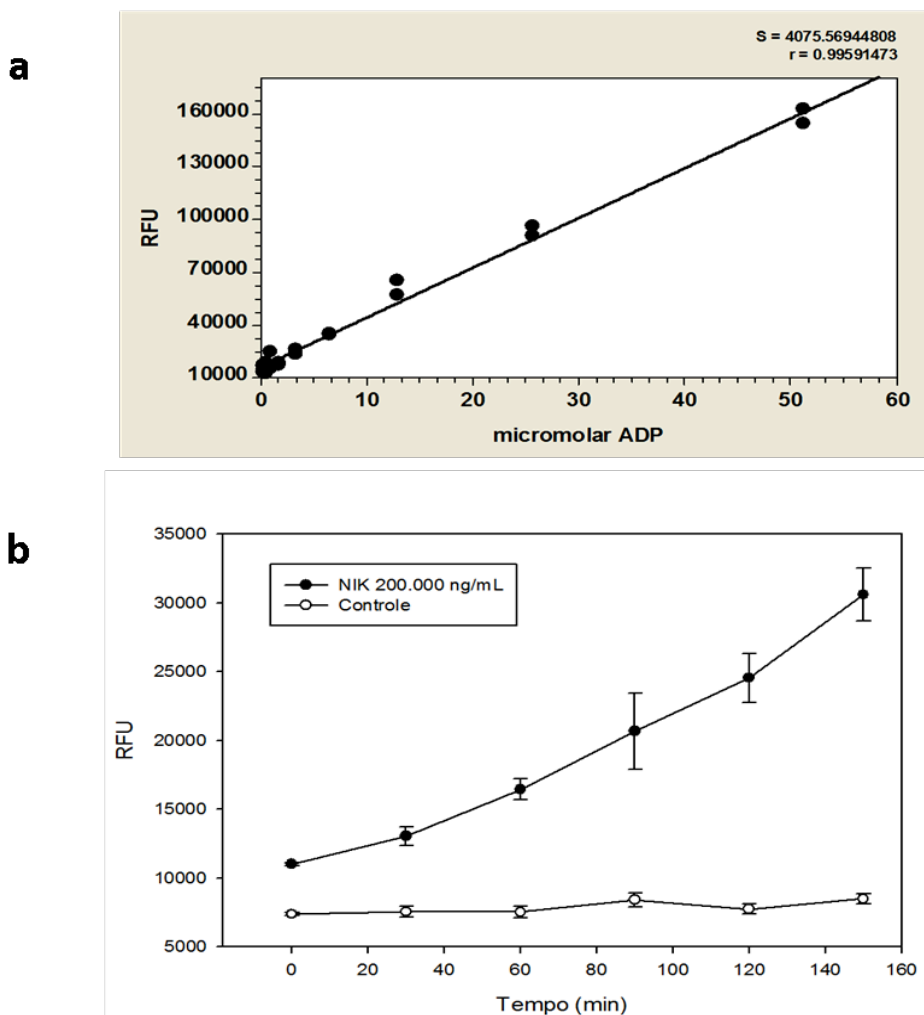


Figura 2. Curva padrão de ADP e curva de tempo da atividade de cinase de NIK1. **a.** A curva padrão foi obtida variando-se a concentração do ADP numa faixa de 0 a 50 μ M. O ADP foi diluído em tampão de reação contendo HEPES 15mM, NaCl 20mM, EGTA 1mM, Tween 20 a 0,02% e $MgCl_2$ 10mM, pH 7,4. Após adição do reagente de detecção, procedeu-se à leitura das amostras. **b.** A curva de tempo foi obtida medindo-se a atividade de cinase em reações contendo 30 μ M de ATP e 1,5 μ M de KDNIK1 em tampão de reação. Após o término do tempo de cada reação, que foram finalizadas a cada 30 minutos pela adição do reagente de detecção, as leituras de fluorescência foram medidas. Para cada tempo estipulado foi feita uma reação controle sem adição da enzima. Gráficos foram construídos no programa SigmaPlot. A barra de erros representa o desvio padrão da média de 3 repetições. RFU = relative fluorescence units.

3 - A proteína rpL10A inibe NIK1 *in vitro*

Com o objetivo de verificar se a proteína L10A é um substrato direto de NIK1 foi realizado um ensaio de atividade utilizando 1,5 μM de enzima (KDNIK1), 30 μM de L10A e 10 μM de ATP. A atividade de autofosforilação foi medida num ensaio contendo somente KDNIK1 e ATP nas mesmas concentrações citadas acima. Foi feita também uma reação contendo apenas L10A purificada e ATP em tampão de reação. Como controle, utilizou-se um ensaio contendo apenas ATP diluído em tampão de reação (Fig. 3).

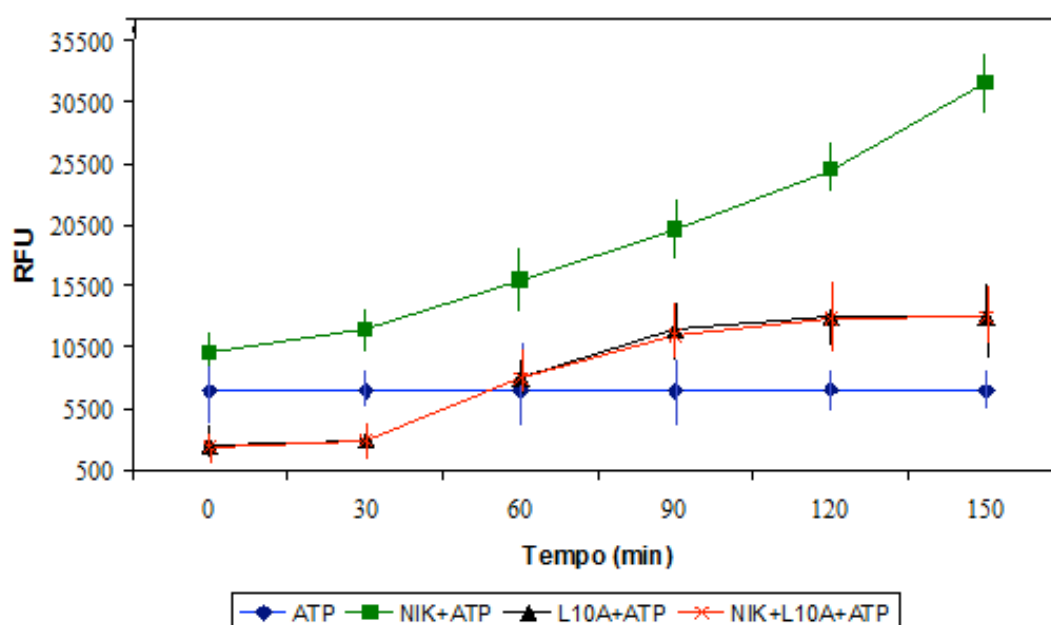


Figura 3. Atividade de cinase de NIK1 usando L10A como substrato. O gráfico de atividade de KDNIK1 foi obtido medindo-se a atividade de cinase em reações contendo 30 μM de L10A, 10 μM de ATP e 1,5 μM de KDNIK1 em tampão de reação (curva em vermelho). A atividade de autofosforilação foi medida utilizando-se 10 μM de ATP e 1,5 μM de KDNIK1 em tampão de reação (curva em verde). Reações contendo 30 μM de L10A e 10 μM de ATP em tampão de reação também foram feitas (curva em preto). Após o término do tempo de cada reação, que foram finalizadas a cada 30 minutos pela adição do reagente de detecção, as leituras de fluorescência foram medidas. Para cada tempo estipulado foi feita uma reação controle sem adição de L10A e de enzima (curva em azul). Gráficos foram construídos no programa SigmaPlot. A barra de erros representa o desvio padrão da média de 3 repetições. RFU = “relative fluorescence unit” (unidade de fluorescência relativa).

O gráfico obtido evidencia que L10A não é um substrato de NIK1, mas sim, um possível inibidor já que sua presença nos ensaios inibe a atividade de cinase de NIK1 (curva em vermelho). Em contrapartida, a atividade de cinase de NIK pode ser visualizada nas reações em que não se adicionou L10A (curva verde). Estes resultados indicam que a proteína rpL10 não é fosforilada por NIK1 *in vitro* mas atua como um possível inibidor da enzima.

Alternativamente, a desnaturação do substrato durante o processo de purificação também poderia explicar esses resultados em que não houve diferença na produção de ADP entre as reações contendo L10A, ATP e NIK e aquelas contendo somente L10A e ATP. Entretanto, esta última alternativa é improvável, uma vez que a proteína rpL10 fusionada a GST foi produzida em *E. Coli* e a purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade. Considerando que a ligação de GST com o substrato glutationa ligado à resina cromatográfica é totalmente dependente de conformação da porção GST, a capacidade da proteína recombinante de ligar especificamente aos resíduos de glutationa implica que a proteína reteve a sua conformação nativa durante o processo de purificação. Similarmente, a proteína NIK foi produzida também como proteína fusionada a GST e purificada por cromatografia de afinidade em alta eficiência. Além disso, a estabilidade de NIK1 foi confirmada pela sua atividade de autofosforilação (curva em verde). Sendo assim, NIK deve utilizar uma proteína intermediária, para direcionar a fosforilação de rpL10 na via de sinalização.

A fim de confirmar a estabilidade da cinase NIK1, foi avaliada a capacidade da proteína purificada em fosforilar o resíduo de treonina na posição 474 que tem mostrado ser crucial para ativação da cinase (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009). Para isso, foi sintetizado um peptídeo, aqui designado pep 2, contendo 22 aminoácidos e uma sequência de resíduos da alça de ativação de NIK que sobrepõe a posição 474 (sequência - GTVGHIAPEYLSTGQSSEK - treonina 474 grifada). Em seguida, o peptídeo foi submetido ao ensaio de fosforilação *in vitro* utilizando o domínio cinase de NIK1 purificado e ATP. Em seguida, a incorporação do fosfato no peptídeo foi avaliada por espectrometria de massa (MS/MS - Fig. 4). O espectro gerado pelo MALDI-TOF-TOF demonstra a

presença de um pico correspondente ao peptídeo bifosforilado (incremento de 204 kD correspondente à incorporação de dois fosfatos e dois adutos de sódio).

O sequenciamento do peptídeo bifosforilado (Fig. 5) confirma a fosforilação no resíduo 474, além de identificar um novo sítio de fosforilação da serina/treonina-cinase correspondente à tirosina na posição 482 presente na sequência da alça de ativação de NIK. A importância biológica desse sítio de fosforilação adicional deverá ser confirmada por mutagênese e ensaios de complementação de *niks* nocautes, conforme previamente descrito em Santos *et al.* (2009).

Receptores do tipo serina/treonina cinases (RLK) que exibem especificidade dupla de fosforilação em serinas/treoninas ou tirosinas incluem BRI1, SERK1 e BAK1. Tais receptores, que pertencem à família RLK, exibem em seus domínios extracelulares quantidades variadas de repetições de leucina. Exceto para SERK1, cuja fosforilação da tirosina somente foi comprovada *in vitro* (Karlova *et al.*, 2009), autofosforilação de resíduos de tirosinas por BRI1 e BAK1 ocorre *in vivo* e possui atividade regulatória (Oh *et al.*, 2009a; Oh *et al.*, 2009b; Oh *et al.*, 2011). Provavelmente, a autofosforilação de NIK no resíduo de tirosina na posição 482 acomoda uma função regulatória na sua atividade de cinase ou na capacidade da proteína de recrutar substratos específicos. Portanto, a comprovação de fosforilação de NIK *in vivo* deve constituir prioridade para as perspectivas futuras.

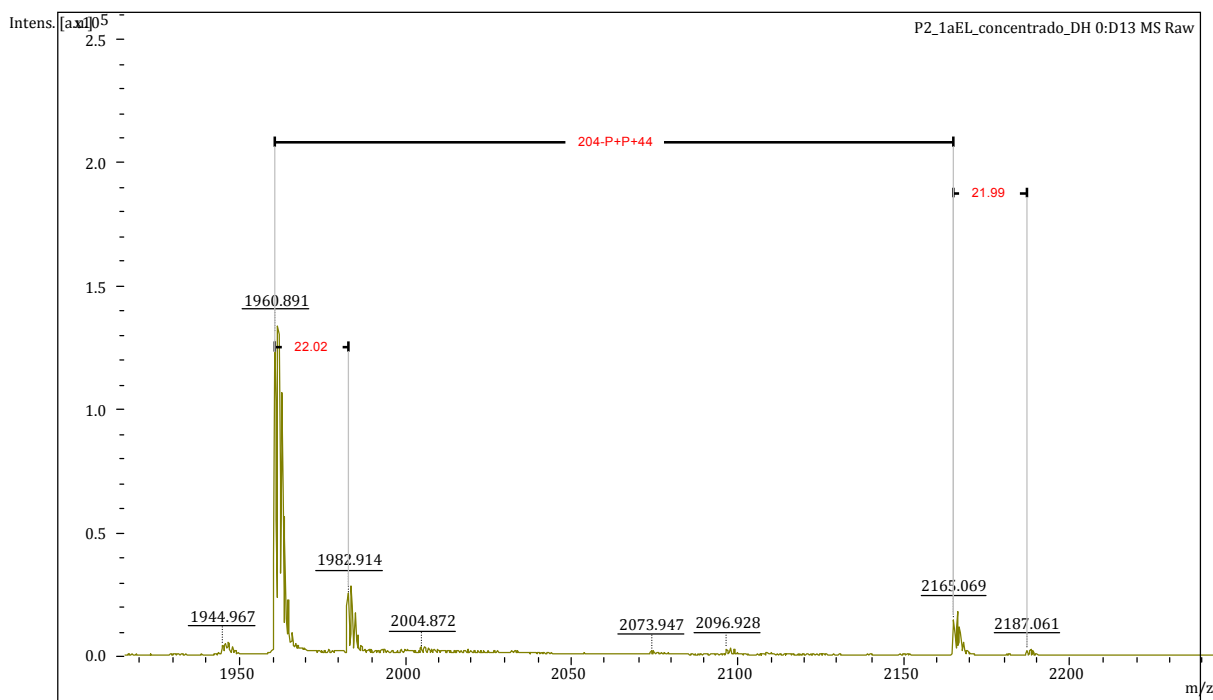


Figura 4. Espectro de massa MS1 do peptídeo P2 do ensaio de fosforilação por NIK1. A diferença de 22,02 daltons indica a presença de um aduto de sódio e 204 daltons indica a adição de 2 grupos fosfato e dois adutos de sódio. A massa do peptídeo não fosforilado é de 1960.891 e a massa do peptídeo fosforilado é de 2165.069. A sequência de aminoácidos é: GTVGHIAPEYLSTGQSSEK. O T grifado refere-se à treonina na posição 474 da sequência de aminoácidos de NIK1.

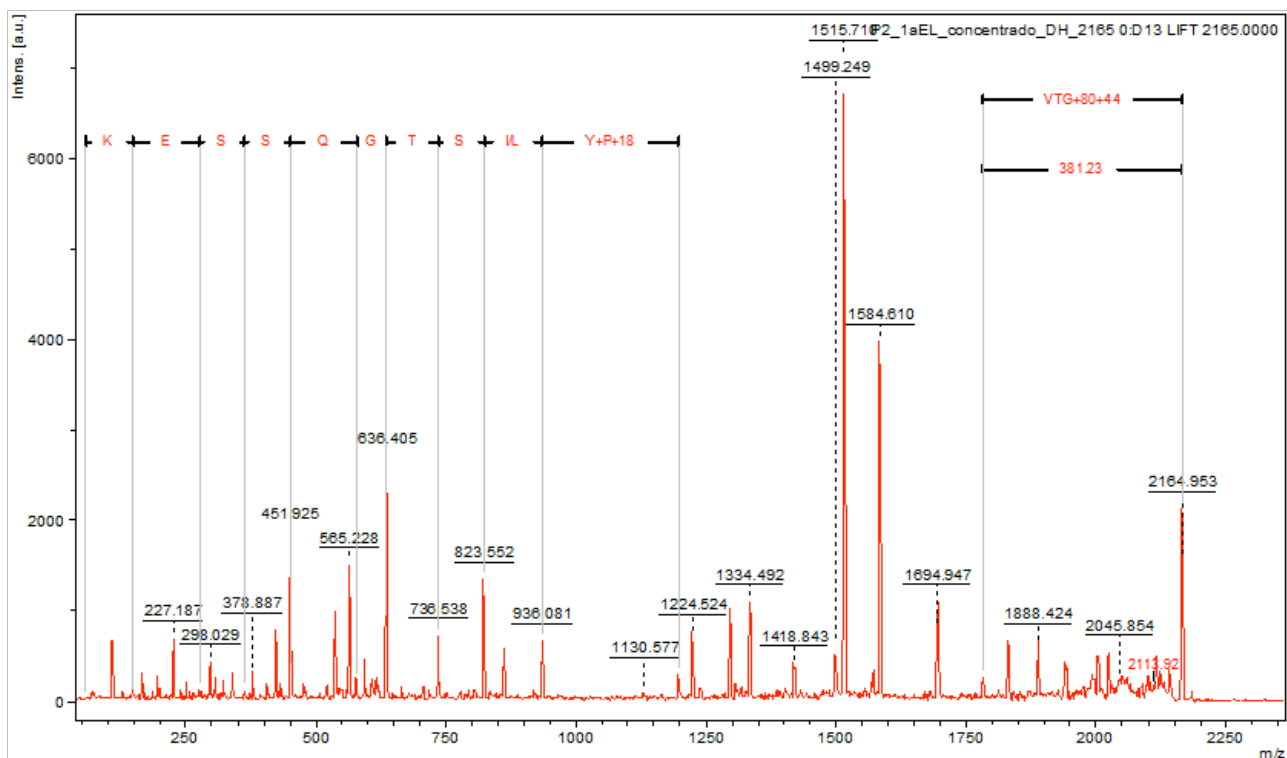


Figura 5. Espectro de massa MS2 do íon 2165 m/z do ensaio de fosforilação de NIK1. A sequência parcial corresponde ao peptídeo P2 fosforilado em dois sítios e com dois adutos de sódio. A sequência de aminoácidos do peptídeo 2 é: GTVGHIAPEYLSTGQSSEK. O T e o Y grifados referem-se a treonina 474 e a tirosina 482 presentes na sequência de aminoácidos de NIK1.

IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barakat, A. Szick-Miranda, K. Chang, I-F. Guyot, R. Blanc, G. Cooke, R. Delseny, M. Bailey-Serres, J.** 2001. The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the *Aabidopsis* Genome. *Plant Physiology* **127**, 398–415.
- Becraft, PW.** 1998. Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Science* **3**, 384-388.
- Bradford, MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
- Braun, DM. Walker, JC.** 1996. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 70-73.
- Carvalho, CM. Santos, AA. Pires, SR. Rocha, SR. Saraiva, DI. Machado, JPB. Mattos, EC. Fietto, LG. Fontes, EPB.** 2008. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK1 represents a defense strategy of plant cells against viruses. *PLoS Pathogen* **4**, e1000247.
- Clark, SE. Williams, RW. Meyerowitz, EM.** 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- Dowdy, SF. Fasching, CL. Araujo, D. Lai, KM. Livanos, E. Weissman, BE. Stanbridge, EJ.** 1991. Suppression of tumorigenicity in Wilms tumor by the P15.5-P14 region of chromosome 11. *Science* **254**, 293-295.
- Dowdy, SF. Lai, KM. Weissman, BE. Matsui, Y. Hogan, BLM. Stanbridge, EJ.** 1995. The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 5763-5769.

- Eisinger, DP. Dick, FA. Trumpower, Bl.** 1997. Qsr1p, a 60s ribosomal subunit protein, is required for joining of 40s and 60s subunits. *Molecular And Cellular Biology* **9**, 5136-5145.
- Fontes, EPB. Santos, AA. Luz, DF. Waclawovsky, AJ. Chory, J.** 2004. The geminivirus NSP acts as virulence factor to suppress an innate transmembrane receptor kinase-mediated defense signaling. *Genes & Development* **18**, 2545-2556.
- Gachomo, EW. Shonukan, OO. Otchoni, SO.** 2003. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African Journal Biotechnology*. **2**, 26-32.
- Gomez-Gomez, L. Boller, T.** 2002. Flagellin perception: A paradigm for innate immunity. *Trends Plant Science* **7**, 251-256.
- Goring, DR. Rothstein, SJ.** 1992. The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* **4**, p.1273-1281.
- Goring, DR. Walker, JC.** 2004. Self-rejection, a new kinase connection. *Science* **303**, 1474-1475.
- Hecht, V. Vielle-Calzada, J. Hartog, MV. Schmidt, EDL. Boutilier, K. Grossniklasu, U. de Vries, S.** 2001. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovule and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* **127**, 803-816.
- Hedges, J. West, M. Johnson, AW.** 2005. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO Journal*. **24**, 567-579.
- Hofer, A. Bussiere, C. Johnson, AW.** 2007. Mutational analysis of the ribosomal protein Rpl10 from yeast. *The Journal of Biological Chemistry* **45**, 32630-32639.

- Imafuku, I. Masaki, T. Waragai, M. Takeuchi, S. Kawabata, M. Hirai, S. Ohno, S. Nee, I.E. Lippa, C.F. Kanazawa, I. Imagawa, M. Okazawa, H.** 1999. Presenilin 1 suppresses the function of c-Jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. *The Journal of Cell Biology* **4**, 121-134.
- Jinn, T.L., Stone, J.M., Walker, J.C. Haesa,** 2000. An Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Development*, v.**14**, p.108-117, 2000.
- Karlova, R. Boeren, S. Van Dongen, W. Kwaaitaal, M. Aker, J. Vervoort, J. de Vries, S.** 2009. Identification of in vitro phosphorylation sites in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis. *Proteomics* **9**, 368-379.
- Li, J. And Chory, J.** 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
- Lin, H.Y. Wang, X.F. Ng-Eaton, E. Weinber, R.A. Lodish, H.F.V.** 1992. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**, 775-785.
- Morillo, S.A. Tax, F.E.** 2006. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Current Opinion of Plant Biology* **9**, 460-469.
- Nam, K.H. Li, J.** 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203–212.
- Oh, H.S. Kwon, H. Sun, S.K. Yang, C-H.** 2002. QM, a Putative Tumor Suppressor, Regulates Proto-oncogene c-Yes. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 36489–36498.
- Oh, M.H. Wang, X. Kota, V. Goshe, B.M. Clouse, D.S. Huber, C.S.** 2009a. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science* **13**, 658-663.
- Oh, M.H. Clouse, S.D. Huber, S.C.** 2009b. Tyrosine phosphorylation in brassinosteroid signaling. *Plant Signal Behaviour* **4**, 1182-1185.

- Oh, MH. Wu, X. Clouse, SD. Huber, SC.** 2011. Functional importance of BAK1 tyrosine phosphorylation in vivo. *Plant Signal Behaviour* **6**, 400-405.
- Rocha, CS. Santos, AA. Machado, JPB. Fontes, EPB.** 2008. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology* **380**, 165-169.
- Sambrook, J. Fritsch, EF. Maniats, T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Santos, AA. Carvalho, CM. Florentino, LH. Ramos, JJO. Fontes, EPB.** 2009. Conserved Threonine Residues within the A-Loop of the Receptor NIK Differentially Regulate the Kinase Function Required for Antiviral Signaling. *PLoS ONE* **4**, e5781.
- Shiu, SH. Bleecker, AB.** 2001. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 10763–10768.
- Shiu, SH. Karlowski, WM. Pan, R. Tzeng, YH. Mayer, KF. Li, WH.** 2004. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The Plant Cell* **16**, 1220-1234.
- Song, WY. Wang, GL. Chen, LL. Kim, HS. Pi, LY. Holsten, T. Gardner, J. Wang, B. Zhai, WX. Zhu, LH.** 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.
- Tör, M. Lotze, MT. Holton, N.** 2009. Receptor mediated signalling in plant: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany*. **60**, 3645-3654.
- Wool, IG.** 1996. Extrarribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Science* **21**, 164-165.
- Zhang, XS. Choi, JH. Heinz, J. Chetty, CS.** 2006. Domain-specific positive selection contributes to the evolution of Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR RLK) genes. *Journal of Molecular Evolution* **63**, 612-21.

Zhao, Y. Guan, H. Shang, F. Wu, RC. Wang, Z. 2005. Overexpression of QM Induces Cell Differentiation and Mineralization in MC3T3-E1. *Nucleic Acids Research* **5**, 5678-5682.

6 - CONCLUSÕES GERAIS

O receptor transmembrana NIK é um componente do sistema imune de plantas inicialmente identificado como alvo de virulência da proteína NSP de ggemínivírus. A proteína NSP de gemínivírus atua inibindo a atividade de autofosforilação e de fosforilação de NIK constituindo, assim, um fator que interfere na via de resposta de defesa mediada por NIK contra o ataque de patógenos. Uma vez que os begomovírus constituem um dos maiores problemas enfrentados pela agricultura mundial, uma alternativa que tem sido considerada seria a manipulação da via de defesa antiviral mediada por NIK para se desenvolverem plantas resistentes ou mais tolerantes a infecção por begomovírus.

A fosforilação da treonina 474 presente na alça de ativação do domínio cinase de NIK é crucial para a ativação da enzima. De fato, a substituição da Treonina 474 por aspartato, um aminoácido fosfomimético, aumenta consideravelmente a atividade de fosforilação do receptor imune. Nesta investigação, foram obtidas plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o mutante NIK-T474D no nível de RNA e proteína. A expressão ectópica da NIK1-T474D em *Arabidopsis* provocou um grande atraso no crescimento das plantas. Uma análise da variação global de expressão gênica por sequenciamento do RNA, utilizando o protocolo Illumina, revelou que a expressão constitutiva de NIK superativa nas plantas causou uma regulação negativa na expressão de genes componentes da maquinaria de tradução. Além disso, a síntese de novas proteínas também diminuiu pela ativação constitutiva de NIK1 nas linhagens T474D. A expressão ectópica de NIK1-T474D também induziu a expressão de genes do sistema imune (genes PR) e um fenótipo de morte celular em plantas transgênicas, que são alterações associadas à resistência adquirida sistêmica via ácido salicílico. O fato das plantas superexpressando NIK1-T474D apresentarem tais características sugere que, provavelmente, exista uma ramificação na via de sinalização mediada por NIK que transduz um sinal de defesa por meio da ativação de genes relacionados ao sistema imune de plantas. Além disso, a diminuição da síntese proteica, assim como a superexpressão de genes relacionados a mecanismos resistência em plantas devem estar relacionadas a um

redirecionamento energético para sustentar os mecanismos envolvidos com a defesa antiviral mediada pela expressão constitutiva de NIK. A performance das linhagens superexpressando NIK1-T474D quando submetidas à infecção por begomovírus evidenciou que expressão ectópica desse transgene em *Arabidopsis* representa uma forma efetiva de se controlar a infecção por begomovírus. Uma vez que o receptor NIK é amplamente distribuído em várias outras espécies de plantas e a interação NIK-NSP é conservada entre diferentes espécies de begomovírus, acredita-se que o desenvolvimento de outras plantas transgênicas superexpressando NIK1-T474D seja uma alternativa atraente para se obter culturas resistentes ou mais tolerantes ao ataque de begomovírus.

Um dos componentes “downstream” da via de sinalização mediada por NIK é a proteína ribossomal L10A. Várias evidências *in vivo* sugerem que L10A é um substrato direto de NIK. No entanto, o ensaio enzimático realizado neste trabalho mostrou que L10A é um inibidor da atividade de NIK *in vitro* não sendo, portanto, substrato direto desse receptor na via de sinalização. Na via de sinalização, NIK deve utilizar uma proteína intermediária para direcionar a fosforilação de rpL10A.

Foi demonstrado previamente que o resíduo de treonina presente na posição 474 da sequência da alça de ativação de NIK é crucial para ativação da cinase. A capacidade de NIK em fosforilar *in vitro* o resíduo de treonina na posição 474 foi avaliada usando como substrato um peptídeo sintético, cuja sequência de aminoácidos sobrepõe uma região da alça de ativação de NIK abrangendo a posição 474 ocupada pela treonina. O peptídeo é fosforilado por NIK1 e a incorporação de dois fosfatos na sua sequência evidenciou que, além da posição 474, o peptídeo também é fosforilado no resíduo de tirosina presente na posição 482. A importância biológica relacionada à fosforilação desse resíduo de tirosina deve ser avaliada, uma vez que essa modificação pode desempenhar um papel regulatório adicional na atividade de NIK.